

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

**Le 23 octobre 2007
Par M. MOURIER Vincent**

**APPORT D'UNE PCR EN TEMPS REEL PAR
TECHNIQUE F.R.E.T. DANS LE DIAGNOSTIC ET
L'EPIDEMIOLOGIE DES CRYPTOSPORIDIOSES
HUMAINES**

JURY

PRESIDENT : Madame B.M. IMBERT, Professeur de Virologie

MEMBRES :

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur M. MIEGEVILLE, MCU-PH-Parasitologie

Examineurs : Monsieur F. RAFFI, PU-PH, Chef du Service de Maladies Infectieuses et Tropicales

Monsieur le Docteur GROSSI Olivier, Chef de Clinique, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales

TABLE DES ABREVIATIONS

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

Ct: Cycle Threshold

FDA: Food and drug Administration

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfert

HAART: highly Active Anti-Retroviral Therapy

IEL: Intra Epithelial Lymphocyte

IPC: Internal Positive Control

MEB: Microscope Electronique à Balayage

MET : Microscope Electronique à Transmission

NASBA : Nucleic Acid Sequence Based Amplification

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SCID: Syndrome d'immunodéficience combinée sévère

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Visualisation microscopique de deux espèces de <i>Cryptosporidium</i>	8
Figure 2 : Données génétiques en l'an 2000 concernant les différentes espèces de cryptosporidies	14
Figure 3 : Lieu de l'étude	24
Figure 4 : Relation entre turbidité et densité d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> par régression linéaire	24
Figure 5 : Observations microscopiques de cryptosporidies au niveau de différents tissus et à différents grossissements	26
Figure 6 : Visualisation in vitro sur cellules HCT-8 des phases d'excystation et de libération des sporozoïtes	28
Figure 7 : Observation de l'excystation au M.E.B.	29
Figure 8 : Représentation d'un sporozoïte	30
Figure 9 : Photographie par MET d'un entérocyte murin parasité par un <i>Cryptosporidium</i>	31
Figure 10 : Photographie par MET de trophozoïtes de <i>Cryptosporidium</i> au sein d'une vacuole parasitophore	32
Figure 11 : Macrogamétocytes de <i>Cryptosporidium</i> à la surface de l'épithélium de la bourse d'une caille	33
Figure 12 : Cycle de multiplication des cryptosporidies	34
Figure 13 : Photographies d'oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i> obtenus sur cellules HCT-8	35
Figure 14 : Cycle de transmission de <i>Cryptosporidium parvum</i>	36
Figure 15 : Diagramme montrant les différents cycles de transmission des cryptosporidies	44
Figure 16 : Infections successives de quatre enfants péruviens	52
Figure 17 : Carte présentant les différentes régions d'isolement des cryptosporidies dans l'étude de Guyot <i>et al.</i>	54
Figure 18 : Relation entre inoculum et périodes d'incubation et d'excrétion des oocystes	62
Figure 19 : Observation d'une selle contenant des cryptosporidies après coloration de Ziehl-Neelsen modifiée	77
Figure 20 : Principe du F.R.E.T.	94
Figure 21 : Principe de la polymérase « hot-start »	98
Figure 22 : Principe du SYBR [®] Green	101
Figure 23 : Exemple de courbes de fusion avant et après analyse des variations de fluorescence	106
Figure 24 : Aspect des courbes de fusion des espèces de cryptosporidies à détecter	106
Figure 25 : Exemples de deux marqueurs de poids moléculaire utilisés dans les gels d'électrophorèse	107
Figure 26 : Résultats des PCR classiques sur les extraits A, B et C par extraction Macherey-Nagel	111
Figure 27 : Courbes de fusion de l'échantillon A en fonction de la concentration du milieu en MgCl ₂	113
Figure 28 : Visualisation sur gel des produits d'amplification en fonction de la concentration du milieu en MgCl ₂	114
Figure 29 : Essais d'amplification menés sur l'échantillon A	115
Figure 30 : Disparition de la fluorescence lors de l'augmentation des températures d'hybridation	116
Figure 31 : Révélation sur gel des échantillons B et C	117
Figure 32 : Résultat du produit de séquençage du produit d'amplification issu de l'extrait B	117
Figure 33 : Comparaison des deux polymérases Taq Platinum [®] et Ex-TaKaRa [®]	120
Figure 34 : Aspect des courbes de fusion des échantillons A, B et D après utilisation du prémix Ex-TaKaRa [®]	121
Figure 35 : Identification par séquençage de l'espèce <i>C. hominis</i>	121
Figure 36 : Produits d'amplification obtenus avec une hybridation de 5 secondes	123
Figure 37 : Produits d'amplification obtenus avec une hybridation de 15 secondes	123
Figure 38 : Résultat des courbes de fusion obtenues à partir des extraits de selles d'animaux	124
Figure 39 : Malgré les dilutions, l'identification d'espèce est aisée	127
Figure 40 : Toutes les dilutions ne donnent pas de détection	128
Figure 41 : Toutes les dilutions ne donnent pas de détection	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification taxonomique des <i>Cryptosporidium</i>	4
Tableau II : Classification des <i>Cryptosporidium</i> au sein des protozoaires	4
Tableau III : Différentes espèces de cryptosporidies et leur date de découverte	6
Tableau IV : Taille comparative des oocystes de différentes espèces de <i>Cryptosporidium</i>	8
Tableau V : Hôtes majeurs et mineurs selon l'espèce de <i>Cryptosporidium</i>	10
Tableau VI : Espèces de cryptosporidies reconnues en 1999 et 2005	16
Tableau VII : Espèces de cryptosporidies retrouvées en fonction des hôtes considérés	18
Tableau VIII : Espèces et génotypes de <i>Cryptosporidium</i> retrouvées chez l'Homme en 2006	21
Tableau IX : Effet de différents facteurs environnementaux sur la survie et l'infectiosité des oocystes	38
Tableau X : Exemples de sites d'infection en fonction de différentes espèces de cryptosporidies	39
Tableau XI : Taux d'infection, de manifestations digestives et de cryptosporidioses cliniques en fonction du nombre d'oocystes ingérés chez 29 volontaires sains	49
Tableau XII : Prévalence des infections à <i>Cryptosporidium</i> en fonction de l'âge	51
Tableau XIII : Prévalence de cinq <i>Cryptosporidium</i> communs chez les humains en fonction des statuts immunitaires et des lieux d'études	53
Tableau XIV : Cas de cryptosporidioses à espèces autres que <i>C. parvum</i> et <i>hominis</i> ayant fait l'objet d'études	53
Tableau XV : Données concernant les espèces de <i>Cryptosporidium</i> isolées en fonction du statut immunitaire des patients en France d'après l'étude de Guyot et al.	55
Tableau XVI : Espèces de <i>Cryptosporidium</i> identifiées lors d'épidémies de cryptosporidioses liées à l'eau	56
Tableau XVII : Caractères cliniques de la maladie chez l'immunocompétent à l'occasion d'une contamination alimentaire	61
Tableau XVIII : Evaluation de la répercussion de la dose d'oocystes ingérés sur la clinique chez 7 volontaires sains	62
Tableau XIX : Caractéristiques de la cryptosporidiose en fonction du terrain immunitaire de l'hôte	66
Tableau XX : Données concernant des volontaires exposés à 3 souches distinctes de <i>C. parvum</i>	69
Tableau XXI : Avantages et inconvénients des kits ELISA et de fluorescence en comparaison des méthodes d'observation classiques	78
Tableau XXII : Tableau récapitulatif des échantillons de selle positifs inclus dans la mise au point de la technique	96
Tableau XXIII : Tableau récapitulatif du mélange réactionnel	103
Tableau XXIV : Espèces de <i>Cryptosporidium</i> détectées par la technique, en fonction de la température de fusion	104
Tableau XXV : Premiers essais de PCR réalisés sur l'échantillon B après variations des quantités d'extraits, du temps d'élongation et des concentrations en MgCl ₂	109
Tableau XXVI : Résultats obtenus sur l'échantillon B après renouvellement de la polymérase et de la solution de MgCl ₂	110
Tableau XXVII : Mélange réactionnel utilisé	112
Tableau XXVIII : Présentation des étapes thermiques lors de l'amplification	113
Tableau XXIX : Essais de variation des températures d'hybridation sur l'extrait A	115
Tableau XXX : Essais de variation des concentrations de sondes F.R.E.T.	118
Tableau XXXI : Mélange réactionnel testé avec le prémix Ex-TaKaRa®	119
Tableau XXXII : Essais de différentes durées d'hybridation sur les échantillons A, B et D	122
Tableau XXXIII : Etude de l'impact des températures d'hybridation sur la spécificité de l'amplification et la détection des signaux	125
Tableau XXXIV : Evaluation de l'impact du ratio des deux sondes F.R.E.T. sur la qualité de l'amplification et des courbes de fusion pour les échantillons A, B et D	126
Tableau XXXV : Tableau comparatif des différentes méthodes utilisées pour la détection des cryptosporidies présentes dans l'échantillon A et ses dilutions successives	127
Tableau XXXVI : Comparaison des sensibilités entre PCR F.R.E.T. et observation microscopique sur l'échantillon D	128
Tableau XXXVII : Comparaison des sensibilités entre PCR F.R.E.T. et observation microscopique sur l'échantillon B	129
Tableau XXXVIII : Récapitulatif des éléments nécessaires au milieu réactionnel	130
Tableau XXXIX : Profil thermique des cycles d'amplification de la technique	131
Tableau XL : Valeurs des températures de fusion constatées en fonction des différentes espèces trouvées	132
Tableau XLI : Présentation des résultats obtenus par PCR F.R.E.T. sur les échantillons conservés au laboratoire de parasitologie de Nantes	133
Tableau XLII : Résultats obtenus par PCR F.R.E.T. sur les échantillons de provenance nigérienne obtenus dans le cadre de l'I.N.A.A.R.V.	135

INTRODUCTION

PARTIE I : LES CRYPTOSPORIDIES

<u>I- LA TAXONOMIE MOUVANTE DES CRYPTOSPORIDIES</u>	5
I.1- HISTORIQUE	5
I.2- CRITERES DE CLASSIFICATION	6
I.2.1- Caractères phénotypiques	7
I.2.1.a- Morphologie parasitaire	
I.2.1.b- Tropicisme parasitaire	
I.2.1.c- Spécificité d'hôte	
I.2.2- Caractères biochimiques	11
I.2.3- Analyses génétiques	12
I.3- LA TAXONOMIE EN 2007	15
<u>II- HABITATS DES <i>CRYPTOSPORIDIUM</i></u>	17
II.1- LES HÔTES ANIMAUX	17
I.1.1- Les hôtes mammifères	17
I.1.1.a- Le bétail	
I.1.1.b- Les animaux sauvages	
I.1.1.c- Les animaux de compagnie	
I.1.1.d- L'être humain	
I.1.2- Les animaux ovipares	21
I.1.2.a- Les oiseaux	
I.1.2.b- Les reptiles	
I.1.2.c- Les poissons	
II.2- LES CRYPTOSPORIDIES DANS L'ENVIRONNEMENT	23
II.2.1- Milieu aquatique	23
II.2.2- Milieu tellurique	24

<u>III- CYCLE DE DEVELOPPEMENT DES <i>CRYPTOSPORIDIUM</i></u>	26
III.1- ETAPES DU CYCLE PARASITAIRE	27
III.1.1- Excystation et invasion	27
III.1.2- Mérogonie ou schizogonie	32
III.1.3- Reproduction sexuée	33
III.1.4- Oocystes	33
III.2- VARIATIONS OBSERVEES EN FONCTION DES ESPECES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	38
III.2.1- Sites de multiplication	38
III.2.3- Durée du cycle parasitaire	39

PARTIE II : LA CRYPTOSPORIDIOSE HUMAINE
--

<u>I- EPIDEMIOLOGIE</u>	42
I.1- GENERALITES	42
I.2- SOURCES DE CONTAMINATIONS HUMAINES	43
I.2.1- Aliments.....	44
I.2.2- Eau.....	45
I.2.3- Contamination par les animaux.....	47
I.2.3.a- Animaux excréteurs	
I.2.3.b- Animaux vecteurs	
I.2.4- Contaminations inter-humaines	48
I.3- DOSES INFECTIEUSES CHEZ L'HOMME	48
I.3.1- DI ₅₀ pour <i>C. parvum</i>	48
I.3.2- DI ₅₀ pour <i>C. hominis</i>	49

I.4- EPIDEMIOLOGIE DES CAS SPORADIQUES DE CRYPTOSPORIDIOSE	50
I.4.1- Population immunocompétente	50
I.4.2- Population immunodéprimée	52
I.5- EPIDEMIOLOGIE DES EPIDEMIES DE CRYPTOSPORIDIOSE	56
<u>II- TRADUCTION CLINIQUE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE CHEZ L’HOMME</u>	60
II.1- SYMPTOMATOLOGIE	60
II.1.1- Les individus sains	60
II.1.2- Les enfants des pays en voie de développement	63
II.1.3- Les immunodéprimés	64
II.1.3.a- Formes d’immunodépression concernées	
II.1.3.b- Particularités cliniques chez les immunodéprimés	
II.2- PHYSIOPATHOLOGIE ET ROLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE	68
II.2.1- Facteurs de virulence des <i>Cryptosporidium</i>	69
II.2.1.a- Facteurs d’adhésion	
II.2.1.b- Toxines	
II.2.1.c- Enzymes parasitaires	
II.2.1.d- Apoptose	
II.2.2- Conséquences cellulaires	70
II.2.3- Physiopathologie et immunologie propre au patient V.I.H.	71
II.2.4- Immunité anti-cryptosporidiose	72
II.2.4.a- Rôles de l’immunité à médiation humorale et cellulaire	
II.2.4.b- Cas particulier du patient V.I.H.	
<u>III-DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES CAS HUMAINS DE CRYPTOSPORIDIOSE</u>	76
III.1- OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES BIOPSIES	76
III.2- MISE EN EVIDENCE DES OOCYSTES	77
III.3- SEROLOGIE	79

<u>IV- TRAITEMENT DE L'INFECTION</u>	81
IV.1- CHEZ L'IMMUNOCOMPETENT	81
IV.2- CHEZ L'IMMUNODEPRIME	81
IV.2.1- Traitement spécifique	81
IV.2.2- Diminution de l'immunodépression	83
<u>V- PREVENTION</u>	84
V.1- PREVENTION INDIVIDUELLE : CONSEILS AUX IMMUNODEPRIMES	84
V.2- PREVENTION COLLECTIVE	85
V.2.1- Mesures de prévention des contaminations liées au bétail	85
V.2.2- Mesures de prévention des transmissions inter-humaines	86
V.2.3- Mesures de prévention des transmissions liées à l'eau	86
V.2.3.a- Eau de consommation	
V.2.3.b- Eaux de loisir	
V.2.4- Surveillance des cas humains de cryptosporidiose	88

PARTIE III : MISE AU POINT D'UNE METHODE DIAGNOSTIQUE PAR PCR F.R.E.T.

<u>I- INTERETS ET OBJECTIFS D'UNE PCR A VISEE DIAGNOSTIC ET EPIDEMIOLOGIQUE</u>	91
<u>II- MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE</u>	93
II.1- MATERIEL DE BASE	93
II.1.1- Méthode utilisée	93
II.1.2- Appareillage utilisé	94
II.1.3- Echantillons utilisés	95
II.1.3.a- Echantillons du CHU de Nantes	
II.1.3.b- Echantillon du contrôle qualité	
II.1.3.c- Echantillons vétérinaires	

II.1.4- Extraction	96
II.1.5- Séquence amplifiée	98
II.1.6- Amorces	99
II.1.7- Nucléotides	99
II.1.8- UDG	100
II.1.9- SYBR [®] Green	100
II.1.10- Sondes FRET	101
II.1.11- Magnésium	103
II.1.12- Témoins internes	103
II.1.13- Extraits	103
II.1.14- Cycles de température	104
II.1.15- Analyse des courbes de fusion	104
II.1.16- Gel de révélation	107
II.1.17- PCR cryptosporidies déjà existante	108
II.2- MISE AU POINT	109
II.2.1- Extraction	110
II.2.2- Adaptation de la PCR	112
II.2.3- Adaptation des températures d'hybridation	114
II.2.4- Optimisation du ratio entre les deux sondes	125
II.2.5- Sensibilité de la technique	126
II.2.5.a- <i>C. parvum</i>	
II.2.5.b- <i>C. hominis</i>	
II.2.5.c- <i>C. felis</i>	
II.3- RESUME DES CARACTERISTIQUES DE LA PCR	130
II.3.1- Extraction	130
II.3.2- Préparation du mélange réactionnel	130

II.3.3- Cycles de températures	131
II.3.4- Lecture de fluorescence en temps réel	131
II.3.5- Lecture des courbes de fusion	132
II.3.6- Résultat des échantillons étudiés	133
II.3.6.a- Echantillons ayant servi à la mise au point de la technique	
II.3.6.b- Echantillons du Niger (I.N.A.A.R.V.)	
<u>III- DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	137
<u>ANNEXES</u>	142
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	166

INTRODUCTION

Cryptosporidium muris, premier représentant des cryptosporidies, est découvert par Ernest Edward Tyzzer en 1907. Qui aurait cru alors que cette espèce découverte fortuitement chez des rongeurs acquièrerait un rôle majeur en pathologie animale puis humaine ? C'est seulement dans les années 1970 qu'une place lui est concédée au sein des parasites pathogènes, d'abord chez les animaux immunodéprimés puis immunocompétents, et enfin en pathologie humaine avec la publication du premier cas de cryptosporidiose chez un enfant en 1976.

L'émergence du S.I.D.A. au début des années 1980 confirme l'importance incontournable de ce parasite. Les recherches initiées à cette époque ont permis d'acquérir une connaissance plus approfondie de ce genre parasitaire : dès 1984, Levine met en évidence sa grande hétérogénéité et évoque l'existence de nombreuses espèces en son sein, liées à des hôtes animaux différents. Avec la description d'épidémies majeures de cryptosporidiose dans les années 1990 aux USA, touchant les individus immunocompétents, vient la consécration de cette parasitose qui devient aux yeux des scientifiques une cause majeure de diarrhées parasitaires dans le monde.

Les modes de transmission sont étudiés mais restent en partie mal connus. Si le rôle de l'eau contaminée par les oocystes issus des excréments d'animaux est bien établi, il reste de nombreuses inconnues quant aux différents cycles de transmission.

La maîtrise de ces épidémies est pourtant entièrement dépendante de la connaissance approfondie de l'épidémiologie de cette parasitose. Elle suppose pour ce faire une parfaite connaissance des hôtes infectés et contaminants ainsi que l'étude des modes de transmission des oocystes responsables de la propagation des épidémies.

Nul doute alors qu'une méthode diagnostique sensible et spécifique, apportant en sus des informations épidémiologiques puisse aider à la compréhension et à la maîtrise de ces épidémies.

Que sait-on en 2007 de ce parasite et de cette parasitose ? Quelle importance accorder à la mise au point d'une technique d'amplification génique de type Polymérase Chain Reaction (PCR) apportant des données épidémiologiques ? Comment mettre au point cette technique ? Autant de questions qui font l'objet de ce mémoire.

**PREMIERE PARTIE :
LES CRYPTOSPORIDIES**

Les cryptosporidies sont des protozoaires intracellulaires obligatoires (Fayer, Morgan *et al.* 2000) appartenant au *phylum* des *Apicomplexa*. Celui-ci regroupe par ailleurs des protozoaires parasites de l'Homme aussi divers que *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Plasmodium*, *Cyclospora* ou encore *Isospora*. Les cryptosporidies s'en distinguent par leur production d'oocystes éliminés par voie fécale, directement contaminants et contenant quatre sporozoïtes, ainsi que par leur cycle monoxène (O'Donoghue 1995; Smith, Nichols *et al.* 2005). La classification zoologique est présentée dans les **tableaux I et II**.

Classification		Caractères
Royaume	<i>Protozoa</i>	Organismes unicellulaires
Phylum	<i>Apicomplexa</i>	Toutes les espèces sont des parasites Présence d'un complexe apical
Classe	<i>Sporozoa</i>	Reproduction sexuée et asexuée avec production d'oocystes
Sous-classe	<i>Coccidia</i>	Cycle de développement impliquant généralement mérogonie, gamétonie et sporogonie avec de petits gamontes
Ordre	<i>Eucoccidia</i>	Mérogonie (ou schizogonie) présente
Sous-ordre	<i>Eimeriina</i>	Développement indépendant des macro- et microgamontes Zygotes immobiles
Famille	<i>Cryptosporiidae</i>	Oocystes contenant 4 sporozoïtes nus Oocystes directement infectieux Développement intracellulaire Cycle monoxène

Tableau I : Classification taxonomique des *Cryptosporidium* (d'après O'Donoghue 1995; Smith, Nichols *et al.* 2005)

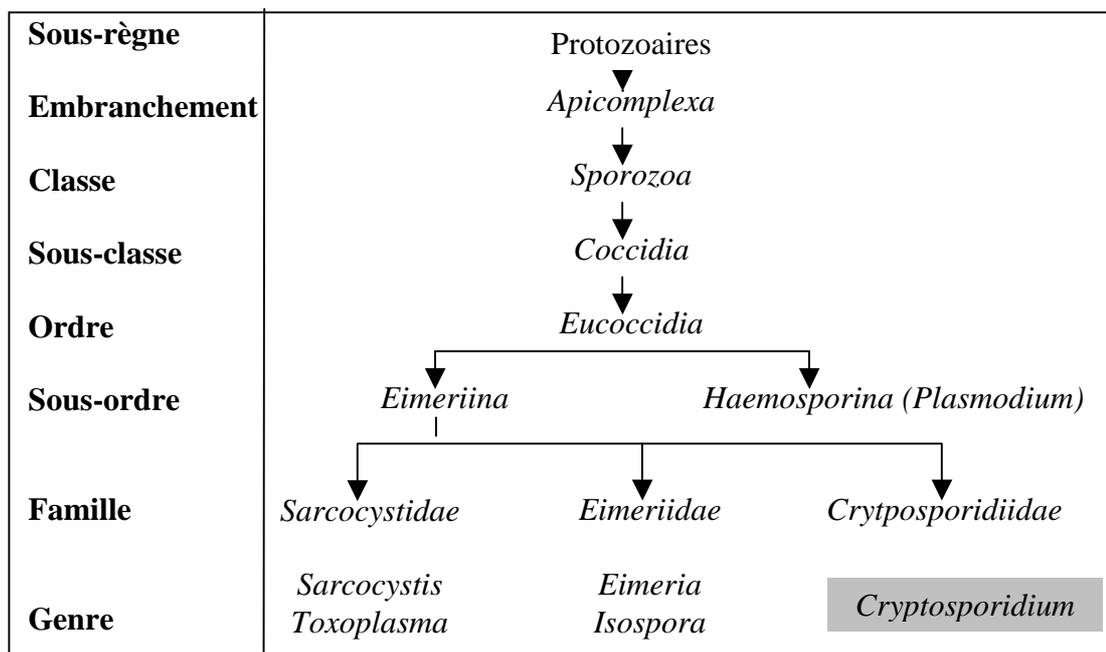


Tableau II : Classification des *Cryptosporidium* au sein des protozoaires

Encadré 1 :

L'appartenance à la sous-classe des *Coccidia* est actuellement discutée, en raison de l'absence d'organelle mitochondrial. Une parenté semble par contre apparaître avec les Grégarines, parasites des invertébrés et membre des *Apicomplexa* (Xiao, Fayer *et al.* 2004; Smith, Nichols *et al.* 2005). Des données moléculaires récentes tendent à montrer par ailleurs une parenté ancestrale avec le genre bactérien *Helicobacter* (Fayer 2004).

I-LA TAXONOMIE MOUVANTE DES *CRYPTOSPORIDIUM*

S'attaquer à la taxonomie des cryptosporidies suppose s'armer d'une bonne dose de courage tant l'évolution est rapide et les chemins empruntés tortueux. Nous tâcherons de simplifier les choses en évitant de devenir simplistes.

I.1- Historique

C'est en 1907 qu'a lieu la première observation de ce qui allait devenir un *Cryptosporidium*. Ernest Edward Tyzzer observe alors un protozoaire d'un nouveau genre dans les glandes gastriques de ses souris de laboratoire (Fayer 2004). S'en suit en 1910 l'appellation du premier représentant de cette nouvelle espèce : *Cryptosporidium muris*. En 1912 est décrite la deuxième espèce : *Cryptosporidium parvum*. Toujours observée chez la souris, elle se distingue de l'espèce précédente par son développement intestinal et par la forme de ses oocystes, plus petits et de forme sphérique (Xiao, Morgan *et al.* 2000), contrairement aux oocystes ovoïdes de la première espèce.

Il faudra attendre 43 ans avant de découvrir le troisième représentant du genre en 1955 : *Cryptosporidium meleagridis*, parasite du dindon (*Meleagris gallopavo*).

Les années 1970 et surtout 1980, avec l'apparition des premiers cas de cryptosporidioses animales et humaines, sont marquées par un regain d'intérêt et l'arrivée de nombreuses nouvelles espèces de cryptosporidies ou suspectées telles (**Tableau III**) qui sont évoquées et reniées successivement en fonction de l'état des connaissances scientifiques. On comparera les espèces nommées en 1995 (**Annexe 1**) et celles acceptées aujourd'hui (**Tableau VI page 16**).

Espèces	Dates de découverte (1 ^{ère} publication)
<i>C. muris</i>	1910
<i>C. parvum</i>	1912
<i>C. meleagridis</i>	1955
<i>C. wrairi</i>	1971
<i>C. felis</i>	1979
<i>C. serpentis</i>	1980
<i>C. nasorum</i>	1981
<i>C. baileyi</i>	1986
<i>C. varanii</i>	1995
<i>C. saurophilum</i>	1998
<i>C. andersoni</i>	2000
<i>C. canis</i>	2001
<i>C. molnari</i>	2002
<i>C. hominis</i>	2002
<i>C. galli</i>	2003

Tableau III : Différentes espèces de cryptosporidies et leur date de découverte (Fayer 2004)

I.2- Critères de classification

La toute première méthode de classification des cryptosporidies a reposé essentiellement sur la spécificité d'hôte présumée stricte de ces parasites (Kosek, Alcantara *et al.* 2001). Le nom de chacune des espèces découverte était attribué en conséquence (Xiao, Morgan *et al.* 2000), ainsi *muris* pour les cryptosporidies isolées de la souris, *meleagridis* du dindon, *serpentis* du serpent, *galli* des volailles, *felis* du chat, *nasorum* du poisson (*Naso lituratus*) ...

Il s'agissait cependant d'un raisonnement erroné et plusieurs critères, phénotypiques, biochimiques puis génétiques sont apparus nécessaires pour distinguer les espèces entre elles. Les noms d'espèces ont alors trouvé d'autres bases que leur hôte spécifique théorique, ainsi *Cryptosporidium baileyi*, parasite des oiseaux, dont le nom est issu de W. S. Bailey, Président de l'Université d'Auburn (Xiao, Fayer *et al.* 2004).

I.2.1 - Caractères phénotypiques

L'étude de la morphologie des oocystes, du tropisme tissulaire parasitaire ainsi que de la spécificité d'hôte sont aujourd'hui les trois critères de nomination des espèces du genre *Cryptosporidium*.

I.2.1.a – Morphologie parasitaire

Il s'agit essentiellement de l'étude de la taille et de la forme des oocystes excrétés dans les selles des animaux étudiés, après observation microscopique (**Figure 1, Tableau IV**).

Toutefois, les seuls critères de taille et de forme, s'ils apportent quelques renseignements parfois importants (**Encadré 2**) comme ce fut le cas en 1912, s'avèrent souvent trop peu distinctifs pour mettre en évidence des différences marquées entre les espèces. Seuls les oocystes issus des cryptosporidies parasitant les reptiles et les poissons montrent des différences significatives par rapport à toutes les autres espèces.

Encadré 2 :

La taille et la forme des oocystes ont permis de distinguer deux espèces de cryptosporidies d'un même hôte tels que *C. baileyi* et *C. meleagridis* chez les oiseaux (Xiao, Fayer *et al.* 2004).

D'autre part, leur étude est limitée à des analyses d'observation purement statistiques portant sur la taille et la forme observables au microscope, leur structure interne étant très mal connue et ne se prêtant pas à une analyse microscopique comparative.

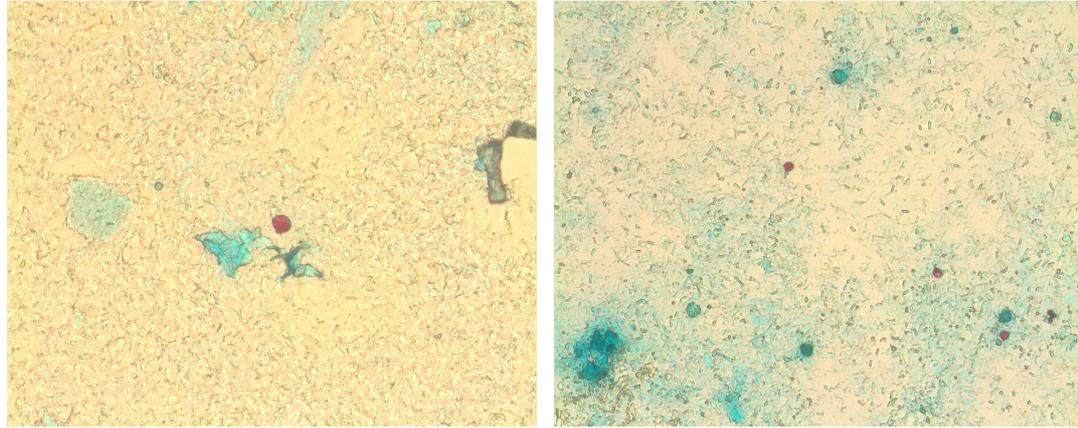


Figure 1 : Visualisation microscopique de deux espèces de *Cryptosporidium* : *C. felis* à gauche et *C. parvum* à droite (X20). L'observation microscopique montre des cryptosporidies d'aspect très semblable.

Espèces	Site de prédilection	Dimensions des oocystes		
		Longueur (µm)	Largeur (µm)	Index de taille (longueur/largeur)
<i>C. parvum</i>	Intestin	4.8-5.6 (5.2)	4.2-4.8 (4.6)	1.04-1.33 (1.16)
<i>C. wrairi</i>	Intestin	4.8-5.6 (5.4)	4.0-5.0 (4.6)	1.04-1.33 (1.17)
<i>C. meleagridis</i>	Intestin	4.5-6.0 (5.2)	4.2-5.3 (4.6)	1.00-1.33 (1.13)
<i>C. saurophilum</i>	Intestin	4.4-5.6 (5.0)	4.2-5.2 (4.7)	1.04-1.12 (1.09)
<i>C. felis</i>	Intestin	3.2-5.1 (4.6)	3.0-4.0 (4.0)	1.15
<i>C. baileyi</i>	Bourse de Fabricius, intestin, cloaque et trachée	6.0-7.5 (6.6)	4.8-5.7 (5.0)	1.05-1.79 (1.33)
<i>C. muris</i>	Estomac	8.0-9.2 (8.4)	5.8-6.4 (6.2)	1.25-1.59 (1.35)
<i>C. andersoni</i>	Caillette	6.0-8.1 (7.4)	5.0-6.5 (5.5)	1.07-1.50 (1.35)
<i>C. serpentis</i>	Estomac	5.6-6.6 (6.2)	4.8-5.6 (5.3)	1.04-1.33 (1.16)
<i>C. nasorum</i>	Estomac et intestin	3.5-4.7 (4.3)	2.5-4.0 (3.3)	

Tableau IV : Taille comparative des oocystes de différentes espèces de *Cryptosporidium* (d'après Xiao, Morgan *et al.* 2000)

I.2.1.b – Tropisme parasitaire

Il s'agit de déterminer le lieu de prédilection de la multiplication parasitaire dans l'organisme contaminé. On distingue par ce biais deux groupes de cryptosporidies : l'un à tropisme intestinal et l'autre à tropisme gastrique, les deux épithéliums présentant des habitats différents en termes d'environnement et de structures cellulaires. C'est ainsi que Tyzzer a différencié *C. muris* de *C. parvum*, les deux espèces présentant le même hôte principal : la souris.

Aujourd'hui, on distingue deux groupes (Kosek, Alcantara *et al.* 2001) regroupant d'un côté *C. muris*, *serpentis*, *andersoni* et *galli* dans les espèces à tropisme gastrique ; et de l'autre côté les cryptosporidies à tropisme intestinal (**Annexe 2**).

Encadré 3 :

L'association de la morphologie parasitaire et du lieu de réplication parasitaire ont permis de distinguer trois espèces d'un même hôte (les oiseaux):

- *C. galli*, à tropisme gastrique
- deux autres espèces à tropisme intestinal mais présentant des oocystes de taille différente : *C. baileyi* et *C. meleagridis*.

I.2.1.c – Spécificité d'hôte

Base initiale de la classification des cryptosporidies, l'hypothèse de la spécificité stricte d'hôte a été battue en brèche par les essais de transmission croisée inter-espèces.

S'il semble exister des hôtes de prédilection pour chacune des espèces du genre *Cryptosporidium*, la spécificité n'est cependant pas stricte (**Tableau V**) et des publications ont montré exceptionnellement la présence de *C. felis* chez le bétail (Gatei, Ashford *et al.* 2002; Pavlasek et Ryan 2007), ou encore de *C. muris* chez l'Homme et chez le chat (Pavlasek et Ryan 2007).

Les différentes espèces ont toutefois un hôte de prédilection. Ainsi, *C. hominis* semble assez strictement adapté aux primates et à l'Homme en particulier puisqu'il n'en a pas été retrouvé de façon naturelle chez d'autres animaux, à l'exception d'un mammifère marin appelé Dugong (Fayer 2004). L'infection a par contre pu être réalisée expérimentalement chez un cochon gnotobiotique, de jeunes agneaux ou de jeunes veaux mais pas chez la souris, même immunodéprimée (Fayer 2004). *A contrario*, *C. muris* semble plus flexible sur sa capacité à infecter d'autres animaux que la souris puisqu'il est retrouvé naturellement chez les humains, les chèvres, le porc ...

Espèces	Hôtes majeurs	Hôtes mineurs
<i>C. parvum</i>	Bovins, moutons, chèvres, humains	Daims, souris, cochons
<i>C. hominis</i>	Humains, singes	Dugong, moutons
<i>C. meleagridis</i>	Dindons, humains	Perroquets
<i>C. felis</i>	Chats	Humains, bovins
<i>C. canis</i>	Chiens	Humains
<i>C. muris</i>	Rongeurs, chameaux de Bactriane	Humains, chèvres, damans
<i>C. andersoni</i>	Bovins, chameaux de Bactriane	Moutons
<i>C. baileyi</i>	Poules, dindons	Canards, autruches, cailles, callopsittes
<i>C. saurophilum</i>	Lézards	Serpents
<i>C. molnari</i>	Poissons	
<i>C. galli</i>	Pinsons, poules, perroquets, serins	
<i>C. serpentis</i>	Serpents, lézards	
<i>C. wrairi</i>	Cobaye	

Tableau V : Hôtes majeurs et mineurs selon l'espèce de *Cryptosporidium* (d'après Xiao, Fayer et al. 2004)

Une seule espèce de *Cryptosporidium* est basée sur sa très stricte spécificité d'hôte : *Cryptosporidium wrairi*, parasite du cobaye (*Cavia porcellus*). Inutile de chercher une étymologie zoologique au nom d'espèce, celui-ci est l'acronyme du Walter Reed Armee Institute of Research (Xiao, Fayer *et al.* 2004). Concernant sa stricte spécificité d'hôte, des transmissions ont tout de même pu être réalisées dans certaines conditions chez la souris et le veau.

Les essais de transmission croisée sont également réalisés sur des animaux immunodéprimés, soit par immaturité du système immunitaire comme chez les souriceaux nouveau-nés, soit de façon artificielle comme pour les souris BALB/c, ou traitées par dexaméthasone, ou encore des souris souffrant d'un syndrome de

déficit immunitaire combiné sévère (SCID). La barrière d'espèce est ainsi réduite à la simple expression d'un tropisme cellulaire abstraction faite de toute influence du système immunitaire naturel de l'hôte (Xiao, Fayer *et al.* 2004).

Malgré tout, les transmissions inter-espèces sont difficiles à réaliser et l'analyse des résultats peut s'avérer également délicate. Des individus adultes infectés expérimentalement peuvent en effet avoir subi une infection préalable potentiellement réactivée lors de l'administration de nouveaux oocystes infectieux.

I.2.2 - Caractères biochimiques

Les études des antigènes de surface parasites et des isoenzymes métaboliques ont très tôt appuyé l'hypothèse de la très grande diversité du genre *Cryptosporidium*.

L'analyse des isoenzymes de la phosphoglucomutase, de l'hexokinase (Awad-el-Kariem, Robinson *et al.* 1995) et de la glucose phosphate synthase ont ainsi permis de montrer l'existence de deux sous-espèces au sein de l'entité *C. parvum*. L'une des entités semblait posséder un tropisme humain et a donc été désignée génotype I, H ou humain ; tandis que l'autre semblait posséder un tropisme bovin et a été désignée génotype II, C (pour « cattle ») ou bovin. Il s'agissait en fait de deux espèces différentes appelées aujourd'hui *C. hominis* et *C. parvum stricto sensu*, hypothèse appuyée secondairement par les essais de transmission croisée et les études moléculaires (**Encadré 4**).

L'interprétation de ces données biochimiques prises isolément est cependant délicate car il demeure difficile de faire la part des choses entre variabilité intra-espèce liée à la diversité génétique de l'espèce elle-même, et variabilité inter-espèce, existant entre deux espèces animales bien différentes.

Encadré 4 : Histoire de *Cryptosporidium parvum*

Indifférenciables morphologiquement (Carey, Lee *et al.* 2004), *C. hominis* et *C. parvum stricto sensu* étaient jusqu'à récemment regroupés au sein d'une même espèce dite *C. parvum*. Les études moléculaires et biochimiques avaient permis de distinguer deux sous-espèces en 1997 (Hunter et Thompson 2005): un génotype humain ou génotype I ou H et un génotype bovin ou génotype II ou C. L'étude des spécificités d'hôte confrontée aux études moléculaires a depuis permis la séparation en 2002 de ces deux génotypes en deux espèces distinctes possédant un ancêtre commun (Tanriverdi and Widmer 2006).

Cette théorie est appuyée par leur spectre d'hôte différent : l'espèce *C. hominis* présente une spécificité bien plus étroite que son équivalent bovin . Celui-ci est facilement infectieux pour l'Homme ou le bétail (espèce anthro-zoonotique), ce qui n'est inversement pas vrai pour *C. hominis* vis à vis des bovins ou des autres espèces animales (espèce anthroponotique) (Hashim, Mulcahy *et al.* 2006).

Aujourd'hui, le terme *Cryptosporidium parvum* ne doit plus être utilisé que pour désigner l'ancien génotype II ou bovin (Xiao, Fayer *et al.* 2004).

I.2.3 – Analyses génétiques

Les premières techniques de biologie moléculaire telles que la R.A.P.D. (Random Amplified Polymorphic DNA) et la R.F.L.P. (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont vite montré une diversité génétique importante au sein du genre (Fayer, Morgan *et al.* 2000; Carey, Lee *et al.* 2004).

Avec l'avènement des techniques de séquençage, de nombreux gènes ont fait l'objet d'études moléculaires. Pour les cryptosporidies, il s'agit essentiellement des gènes du SSU-rRNA 18S d'évolution lente et des gènes de l'HSP70 (Heat Shock Protein) et de l'actine, hautement polymorphiques pour leur part. Ces derniers gènes sont utiles pour analyser la diversité d'espèces phylogénétiquement proches et séparées depuis peu à l'échelle de l'évolution (Kosek, Alcantara *et al.* 2001; Ramirez, Ward *et al.* 2004).

D'autres gènes ont fait l'objet d'études génétiques tels que les gènes des protéines TRAP-C1 et TRAP-C2 (Thrombospondin Related Spacer), COWP

(Cryptosporidium Oocyst Wall Protein), ITS (Internal Transcribed Spacer), dhfr-ts (dihydrofolate réductase synthase) ainsi que des micro- (Peng, Xiao *et al.* 1997) et minisatellites (Tanriverdi et Widmer 2006).

L'étude du gène du SSU-rRNA 18S couplée à celle du gène de l'HSP70 a montré (Xiao, Morgan *et al.* 2000) l'existence de deux groupes majeurs éloignés phylogénétiquement, l'un constitué de *C. muris* et *serpentis*, l'autre regroupant les autres espèces connues à l'heure actuelle (**Annexe 2, Figure 2**).

Les deux principales difficultés de l'analyse génétique sont les suivantes :

- ✓ quels gènes étudier et comparer ?
- ✓ quel degré de différence génétique nous permet de déclarer qu'il s'agit de deux espèces réellement différentes, autrement dit, comment être sûr qu'il ne s'agit pas d'une variation génétique intra-espèce mais bien d'une variation inter-espèce ?

Autant le dire tout de suite : les questions ne sont pas tranchées et restent à l'appréciation de la communauté scientifique. Aucune consigne internationale ne permet de décider selon des bases fiables et reconnues de tous.

Pour situer la difficulté, rappelons qu'entre l'être humain et le singe, il existe une communauté génétique de l'ordre de 98.77% (Xiao, Fayer *et al.* 2004). Il est évident que nous constituons deux espèces différentes, mais ce sont l'existence de caractères phénotypiques distincts et l'absence de croisement possible donnant lieu à une descendance qui nous le confirme. La situation devient nettement plus complexe lorsque les individus partagent une partie de ressemblance phénotypique, ce qui est le cas des cryptosporidies et qui revient à se plonger dans la version parasitaire des « Animaux dénaturés » de Jean Bruller Vercors !

On se contente de dire aujourd'hui que la distance génétique entre les différentes espèces de cryptosporidies semble similaire à celle observée dans d'autres genres de protozoaires tels que les genres *Eimeria* et *Cyclospora*. De même que la distance génétique entre le *C. parvum* et *C. felis* ou *saurophilum* est similaire à celle existant entre différentes espèces validées d'*Eimeria*.

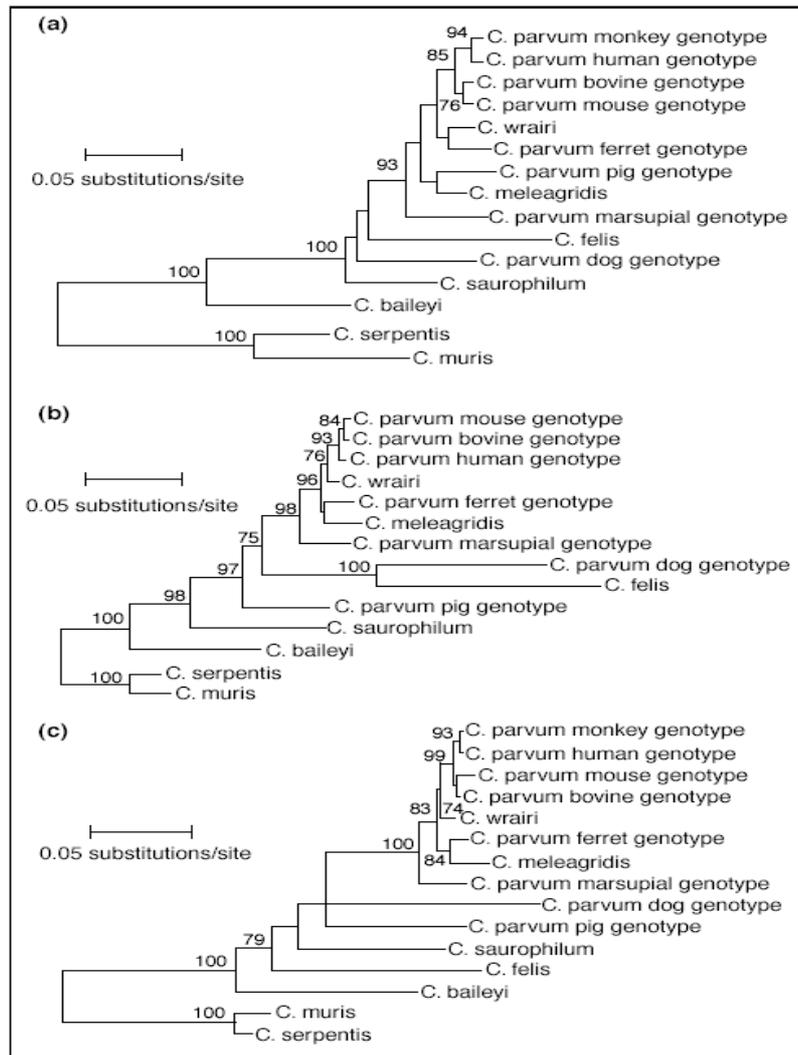


Figure 2 : Données génétiques en l’an 2000 concernant les différentes espèces de cryptosporidies, les récentes espèces ne s’y trouvent pas (d’après Xiao, Morgan *et al.* 2000)

Relations phylogénétiques entre les différentes espèces et les différents génotypes de *Cryptosporidium* en fonction des séquences nucléotidiques du gène du ssu rRNA (a), de la protéine HSP70 (b) et de la protéine de paroi COWP (c)

Quoi qu’il en soit, on voit bien que l’analyse génétique, si utile qu’elle soit, ne peut se suffire à elle-même et doit voir son intérêt dans la confrontation avec les données biologiques d’observation : l’analyse se doit de corrélérer avec les données phénotypiques. C’est seulement l’analyse globale et la confrontation des données qui nous autorisent à établir la liste des différentes espèces : bref, la génétique sans l’observation n’est rien ! et à vouloir se passer de cette dernière, on se retrouve facilement avec des génotypes certes différents de l’espèce souche mais

dont on ne sait que faire à l'heure actuelle tellement ils sont biologiquement proches de leurs voisins!

I.3- La taxonomie en 2007

Il existe des critères internationaux concernant la taxonomie du monde animal. Ils sont publiés par l'I.C.Z.N. (International Commission on Zoological Nomenclature) (Xiao, Fayer *et al.* 2004). Ils indiquent que doivent être pris en compte les critères morphologiques, génétiques ainsi que la spécificité d'hôte.

Les critères génétiques demeurent peu définis puisque les gènes à étudier ne sont pas précisés, de même que la distance génétique nécessaire à l'acceptation d'une nouvelle espèce. Quant à la spécificité d'hôte, toute nouvelle espèce ou décrite comme telle devra être testée chez des hôtes différents et comparée au spectre d'hôte des espèces déjà répertoriées, autant dire que la tâche ne sera pas forcément aisée!

En 2007, les publications ne s'accordent toujours pas entre elles sur la liste exacte des espèces retenues à ce jour. On remarquera que globalement, le nombre d'espèces décrites et confirmées ne cesse d'augmenter, passant de 6 espèces validées pour 21 nommées en 1995 (O'Donoghue 1995) (**Annexe 1**), 8 espèces reconnues en 2000 (Morgan, Xiao *et al.* 1999; Morgan, Weber *et al.* 2000; Kosek, Alcantara *et al.* 2001) à 11, 13 ou 15 espèces en 2004 (Dillingham, Lima *et al.* 2002; Carey, Lee *et al.* 2004; Fayer 2004; Xiao, Fayer *et al.* 2004) et 14 ou 15 espèces en 2005 et 2007 selon les dernières publications (Caccio, Thompson *et al.* 2005; Smith, Nichols *et al.* 2005; Chacin-Bonilla 2007; Pavlasek et Ryan 2007). La liste la plus récente et la plus fiable se trouve ci-après (**Tableau VI**).

Le nombre de génotypes décrits ne cesse d'augmenter, constituant vraisemblablement pour certains des espèces cryptiques, qui gagneront peut-être leur statut d'espèce à part entière dans les années à venir.

Même s'il commence à livrer quelques uns de ses secrets, le monde des cryptosporidies reste à bien des égards encore mystérieux et ouvre de nombreuses perspectives de recherche sur le plan taxonomique.

Espèces reconnues en 1999 (Morgan, Xiao <i>et al.</i> 1999)	Espèces reconnues en 2005 (Caccio, Thompson <i>et al.</i> 2005)
<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>
<i>C. muris</i>	<i>C. muris</i>
<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>
<i>C. felis</i>	<i>C. felis</i>
<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
<i>C. serpentis</i>	<i>C. serpentis</i>
<i>C. wrairi</i>	<i>C. wrairi</i>
<i>C. nasorum</i>	<i>C. molnari</i>
	<i>C. andersoni</i>
	<i>C. hominis</i>
	<i>C. suis</i>
	<i>C. canis</i>
	<i>C. galli</i>
	<i>C. saurophilum</i>

Tableau VI : Espèces de cryptosporidies reconnues en 1999 et 2005. En grisé les nouvelles espèces acceptées par rapport à l'année 1999.

En résumé :

Les *Cryptosporidium* sont des protozoaires intracellulaires appartenant au phylum des *Apicomplexa*. Ce genre renferme de nombreuses espèces qui se différencient essentiellement par la taille et la forme de leurs oocystes, leur spécificité d'hôte plus ou moins stricte, leur lieu de multiplication et leur variabilité génétique, notamment au niveau des gènes du SSU-rRNA 18S, de l'HSP 70 et de l'actine. Au cours du XX^{ème} siècle, le nombre des espèces reconnues n'a cessé d'augmenter. 14 espèces sont à ce jour admises au sein du genre *Cryptosporidium*.

II- HABITATS DES CRYPTOSPORIDIUM

Les cryptosporidies sont des parasites de répartition mondiale, présents sur les six continents et répertoriés dans plus de 90 pays (Fayer, Morgan *et al.* 2000).

Ils parasitent une grande partie du règne animal et sont présents dans l'environnement sous leur forme de résistance : les oocystes.

II.1- Les hôtes animaux

Les cryptosporidies semblent plus présentes chez les mammifères que chez les autres animaux. Mais il faut peut-être y voir une déformation de la réalité car c'est aussi le groupe animal qui a été le plus étudié par les scientifiques (Xiao, Fayer *et al.* 2004). Elles sont également retrouvées dans des hôtes animaux aussi divers que les oiseaux, les reptiles ou encore les poissons (McLauchlin, Amar *et al.* 2000). Seuls les insectes et les mollusques peuvent à ce jour prétendre ne pas figurer sur la liste officielle des hébergements animaux disponibles pour ce genre parasitaire.

II.1.1- Hôtes mammifères

La liste des mammifères connus porteurs de cryptosporidies est longue et ne cesse de s'étoffer avec les années : elle compte 144 espèces en 2004 (**Annexe 3**). Rappelons que les mammifères sont le groupe le plus étudié par les scientifiques.

II.1.1.a- Bétail

De part sa proximité avec l'homme, le bétail joue un rôle important dans l'éventuelle contamination humaine par des cryptosporidies d'origine animale.

Les espèces retrouvées dans ce groupe semblent essentiellement constituées de *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. felis*, *C. suis* et du génotype des *cervidae*.

De façon générale, il apparaît que les cryptosporidies chez les animaux de ferme touchent surtout les jeunes individus ou du moins y expriment plus

facilement leur pouvoir pathogène. Les infections bruyantes concernent ainsi le veau dans les premiers mois de la vie, et les chevreaux et agneaux au cours du premier mois (Ramirez, Ward *et al.* 2004). Tandis que, en dehors de toute immunodépression, porcs et chevaux restent le plus souvent asymptomatiques.

Hôte	Principales cryptosporidies	Autres cryptosporidies
Humain	<i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. canis</i> , <i>C. muris</i> , génotype des <i>cervidae</i> et <i>C. suis</i>
Bovin	<i>C. parvum</i> , <i>C. andersoni</i>	Génotype bovin B, génotype des <i>cervidae</i> , <i>C. felis</i>
Ovins	<i>C. parvum</i>	Génotype bovin B, génotype des <i>cervidae</i> , <i>C. andersoni</i> , <i>C. hominis</i>
Chèvre	<i>C. parvum</i>	<i>C. muris</i> (chèvre de montagne)
Chameau	<i>C. parvum</i> ?, <i>C. andersoni</i>	<i>C. muris</i>
Porc	<i>C. suis</i>	
Cheval	Génotype équin ?	<i>C. parvum</i> ?
Chien	<i>C. canis</i>	
Chat	<i>C. felis</i>	
Souris	<i>C. muris</i> , génotype murin	
Ecureuil	Génotype de l'écureuil, <i>C. muris</i>	
Cervidae	Génotype des <i>cervidae</i> , <i>C. parvum</i>	
Rat musqué	Génotype du rat musqué type I	Génotype du rat musqué type II
Opossum	Génotype de l'opossum type I et II	
Renard	<i>C. canis</i> génotype du renard	Génotype du renard type II, <i>C. canis</i> génotype du chien
Poules	<i>C. baileyi</i>	<i>C. meleagridis</i> , <i>C. galli</i>
Dinde	<i>C. baileyi</i> , <i>C. meleagridis</i>	
Canards et oies	Génotypes des oies I et II	<i>C. baileyi</i> , génotype du canard
Serpents	<i>C. serpentis</i>	<i>C. saurophilum</i> , génotype du serpent W11
Lézards	<i>C. serpentis</i> , <i>C. saurophilum</i>	Génotype du lézard
Tortue	Génotype de la tortue	

Tableau VII : Espèces de cryptosporidies retrouvées en fonction des hôtes considérés en 1999. Données adaptées à la taxonomie de 2007 (d'après Xiao, Fayer *et al.* 2004; Caccio, Thompson *et al.* 2005; Smith, Caccio *et al.* 2006)

La prévalence du portage de cryptosporidies est de 22 % dans les fermes porcines en Espagne. Pour ce qui est des chevaux et poulains, la prévalence de ce même portage s'étale de 6,4% au Royaume unis, 17% au Canada à 100% dans l'état de Louisiane aux USA (Ramirez, Ward *et al.* 2004). Par ailleurs, plus de 90% des fermes laitières aux USA semblent héberger ce parasite. On voit donc l'importance potentielle du bétail dans la contamination humaine.

L'analyse éthologique a montré au sein du troupeau une transmission essentiellement fécale-orale, mais aussi par l'eau ou l'allaitement.

II.1.1.b- Animaux sauvages

Leur atteinte semble la plupart du temps asymptomatique (Ramirez, Ward *et al.* 2004). Les rongeurs pourraient jouer un rôle non négligeable dans la contamination du bétail ou de l'Homme. En effet, ils se trouvent souvent à l'interface entre habitat humain et environnement. Ils pourraient également être en cause dans la contamination des eaux de surface et de l'environnement en général, par excrétion dispersée de leurs oocystes.

Les espèces de cryptosporidies retrouvées parmi les mammifères sauvages regroupent essentiellement *C. muris*, *C. parvum* mais aussi les génotypes des *cervidae* (trois « espèces » au demeurant déjà retrouvées chez l'homme) et le génotype du rat musqué (Ong, Eisler *et al.* 2002).

II.1.1.c- Animaux de compagnie

Les animaux de compagnie sont des suspects idéaux de transmission à l'Homme : ils sont porteurs de cryptosporidies et sont en relation étroite et permanente avec l'Homme. Ce sont donc des vecteurs idéaux de contamination humaine.

Les chiens véhiculent essentiellement l'espèce *C. canis*. Ils sont généralement asymptomatiques, ce qui ne les empêche pas d'excréter leurs oocystes dans leur environnement immédiat. La prévalence semble surtout importante chez les chiots de moins de 6 mois.

Les chats quant à eux sont surtout contaminés par *C. felis*, bien que des infections par *C. muris* aient été exceptionnellement rapportées. La prévalence de l'infection chez le chat est estimée de façon assez large entre 0,75 et 12,2% (Bornay-Llinares, da Silva *et al.* 1999; Pavlasek and Ryan 2007). Les manifestations cliniques semblent contrairement à son collègue canin beaucoup plus fréquentes puisqu'elles concernent jusqu'à 50% des chats infectés (Ramirez, Ward *et al.* 2004). Elles se traduisent par des troubles gastro-intestinaux à type de diarrhées.

Par ailleurs, l'arrivée de nouveaux animaux de compagnie (serpents, lézard, oiseaux exotiques etc...) peut faire craindre l'émergence de nouvelles espèces de cryptosporidies au sein des foyers et donc d'éventuelles nouvelles contaminations humaines, même si la présence d'animaux de compagnie au sein d'un foyer ne semble pas constituer en soi un facteur de risque de cryptosporidiose humaine (Ramirez, Ward *et al.* 2004). Car si des *C. felis* et *canis* ont bien été retrouvés chez des humains, qu'ils soient V.I.H. ou non, aucun auteur n'a pu à ce jour démontrer la contamination directe du chien ou du chat à l'Homme. L'hypothèse peut pourtant sembler assez probable.

II.1.1.d- L'être humain

L'infection humaine fera l'objet de la deuxième partie de ce mémoire. Retenons simplement que l'espèce *C. hominis* semble être assez spécifique de l'Homme puisque rarement retrouvée chez d'autres hôtes naturels, hormis le Dugong, mammifère marin.

Le **tableau VIII** résume les différentes espèces de cryptosporidies retrouvées chez l'Homme à ce jour.

Espèces retrouvées chez l'homme
<i>C. hominis</i>
<i>C. parvum</i> Génotype bovin Génotype des <i>cervidae</i> Génotype des singes
<i>C. meleagridis</i>
<i>C. felis</i>
<i>C. canis</i>
<i>C. muris</i>
<i>C. suis</i> (ancien génotype porcin)

Tableau VIII : Espèces et génotypes de *Cryptosporidium* retrouvées chez l'Homme en 2006 (d'après Xiao, Fayer *et al.* 2004; Smith, Caccio *et al.* 2006; Caccio, Thompson *et al.* 2005)

II.1.2- Animaux ovipares

Ils ont été peu étudiés. Il s'agit essentiellement des oiseaux, des reptiles et des poissons.

II.1.2.a- Oiseaux

Tout comme les autres espèces précédemment citées, les jeunes individus semblent plus sensibles à ces parasites.

Leur présence a été démontrée chez la poule, la dinde, le canard, l'oie, le faisan ou encore la caille (Ramirez, Ward *et al.* 2004).

Trois espèces de cryptosporidies ont été à ce jour décrites chez les oiseaux, à côté des génotypes de l'oie et du canard :

- ✓ *C. baileyi*, responsable d'une atteinte intestinale mais également de la bourse de Fabricius ainsi que de l'épithélium du tractus respiratoire, touchant les sinus, la trachée et les conjonctives. Cette espèce est responsable, outre les signes digestifs, de syndromes respiratoires à type de toux et éternuements.

- ✓ *C. meleagridis*, responsable d'une atteinte intestinale et de la bourse de Fabricius, provoquant diarrhées, déshydratation, asthénie et perte de poids.
- ✓ *C. galli*, de localisation pro-ventriculaire.

Notons que *C. meleagridis* est le troisième *Cryptosporidium* le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme après *C. hominis* et *C. parvum*.

II.1.2.b- Reptiles

On distingue deux espèces à ce jour parmi les reptiles :

- ✓ *C. serpentis*, qui infecte les serpents, les lézards ainsi que les tortues. Etonnamment il atteint surtout les adultes, ce qui pourrait s'expliquer par le régime alimentaire. Il est responsable d'infections persistantes (jusqu'à 2 ans) et provoque ballonnements, asthénie et anorexie.
- ✓ *C. saurophilum*, parasite essentiellement les lézards.

Des génotypes de la tortue, des serpents et des lézards sont également décrits et pourraient constituer des espèces cryptiques.

Aucune de ces espèces n'a été retrouvée à ce jour chez des êtres humains.

II.1.2.c- Poissons

Deux espèces sont actuellement reconnues :

- ✓ *C. nesorum*, décrit chez le poisson chat en particulier, mais aussi le poisson d'élevage. La transmission entre les individus pourrait se réaliser *via* des micro-crustacés, simples vecteurs des parasites. Leur action filtrante leur permet d'accumuler les oocystes présents dans l'environnement avant de les transmettre

à leurs prédateurs naturels. C'est le cas d'*Artemia franciscana metanauplii*, micro-crustacé utilisé comme aliment pour le poisson d'élevage et qui constitue un vecteur du parasite au sein des élevages (Mendez-Hermida, Gomez-Couso *et al.* 2007).

- ✓ *C. molnari*, dont le nom est issu du parasitologue hongrois Kalmar Molnar.

Aucun cas humain de contamination par des cryptosporidies parasites du poisson n'a été décrit à ce jour.

II.2- Les cryptosporidies dans l'environnement

L'excrétion des oocystes dans les fèces des animaux et de l'Homme est responsable de la contamination de l'environnement. Les oocystes étant extrêmement résistants aux conditions extérieures, il n'est pas étonnant de les voir répartis dans des milieux aussi différents que les végétaux, l'eau douce ou salée, mais également le sol, en surface ou en profondeur.

A titre d'exemple, mais nous y reviendrons ultérieurement, il a été constaté que les oocystes demeuraient viables plus de six mois dans l'eau (Fayer 2004).

II.2.1- Milieu aquatique

Des études effectuées aux USA montrent que les oocystes de cryptosporidies sont retrouvés très fréquemment au niveau des eaux de surface. Il s'agit d'eau de rivières, lacs ou étangs. Les oocystes y sont retrouvés dans 4 à 100% des cas (LeChevallier, Norton *et al.* 1991; Carey, Lee *et al.* 2004; Fayer 2004; Ramirez, Ward *et al.* 2004) avec des valeurs de concentrations comprises entre 0,1 et 10 000 oocystes pour 100L d'eau (Fayer 2004). Dans une étude menée aux USA et au Canada en 1991 (**Figure 3**) sur des eaux de surface avant traitement, les oocystes de cryptosporidies ont été retrouvés dans 87% des échantillons avec une

moyenne de 2,70 oocystes par litre d'eau analysée (valeurs s'étalant de 0,07 à 484 par litre) (LeChevallier, Norton *et al.* 1991). Un lien direct a été retrouvé avec l'indice de turbidité de l'eau (**Figure 4**), ce qui n'est guère étonnant : l'étude de la turbidité par néphélométrie apporte des renseignements sur la qualité de l'eau.



Figure 3 : Lieux de l'étude (LeChevallier, Norton *et al.* 1991). Il s'agit d'une surface limitée des USA.

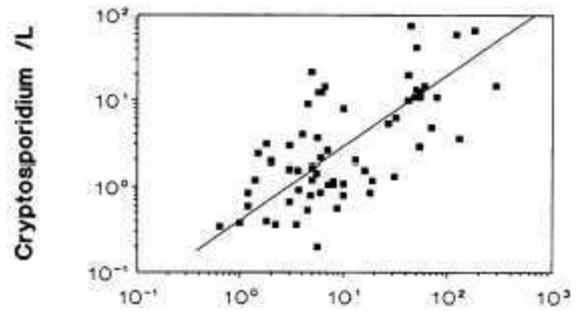


Figure 4 : Relation entre turbidité et densité d'oocystes de *Cryptosporidium* par régression linéaire. $p < 0.01$. (LeChevallier, Norton *et al.* 1991)

Sur ces mêmes sites, après les processus de filtration et de désinfection, des cryptosporidies ont été retrouvées dans 27 % des échantillons analysés (LeChevallier, Norton *et al.* 1991).

L'eau de sous-sol est également susceptible de contenir des oocystes même si la probabilité en est moins forte (9,5 à 22% d'échantillons positifs) en raison du processus naturel de filtration de l'eau par les différentes couches du sol (Fayer 2004).

Quant à l'eau de mer, elle contient aussi des oocystes (Fayer 2004), en particulier à proximité des déversements d'eaux usées. Les crustacés peuvent jouer un rôle dans les contaminations par leur rôle filtrant et accumulateur. A titre d'exemple, *C. hominis* et *parvum* ont été retrouvés chez l'huître et la moule.

II.2.2- Milieu tellurique

Au niveau des sols, les oocystes sont très fréquemment retrouvés, et en Grande Bretagne, on estime que jusqu'à 1/5^{ème} des oocystes retrouvés en terrain agricole

provient de leur excrétion par les animaux sauvages environnants. Les oocystes sont surtout retrouvés au niveau des deux premiers centimètres d'épaisseur et jusqu'à 30 cm. Aucun par contre ne semble persister à une profondeur de 70 cm (Fayer, Morgan *et al.* 2000).

Une particularité est à noter : les sols acides semblent plus propices à la conservation des oocystes (Fayer 2004) que les sols calcaires.

En ce qui concerne les végétaux et notamment les légumes, ils peuvent constituer une source importante de contamination pour l'Homme. Des oocystes sont retrouvés à leur surface. Leur provenance peut être variée : eau d'écoulement charriant les oocystes présents sur le sol mais également mains des cueilleurs, ou surfaces inertes de stockage par exemple.

En résumé :

Les cryptosporidies sont des parasites de répartition mondiale. Ils contaminent une grande partie du règne animal dont les mammifères et les animaux ovipares.

Les animaux d'élevage, de compagnie et les mammifères sauvages constituent des réservoirs importants de cryptosporidies éventuellement transmissibles à l'Homme.

Les *Cryptosporidium* sont également présents dans l'environnement sous leur forme de résistance : les oocystes.

III- CYCLE DE DEVELOPPEMENT DES CRYPTOSPORIDIUM

Le cycle de développement des cryptosporidies se déroule à la fois dans les entérocytes et dans la lumière intestinale.

L'observation histologique des tissus infectés par les cryptosporidies montre des corps basophiles attachés à la surface apicale des cellules mais en position intra-cellulaire (**Figure 5**) (O'Donoghue 1995).

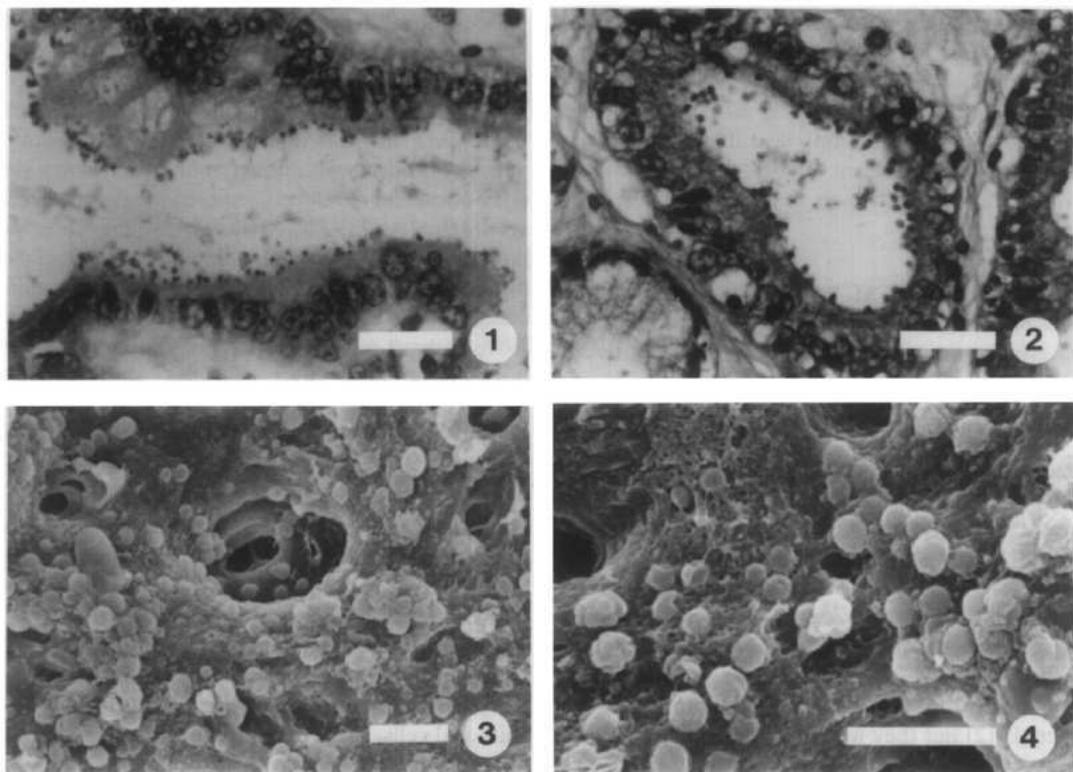


Figure 5 : Observations microscopiques de cryptosporidies au niveau de différents tissus et à différents grossissements (O'Donoghue 1995)

Photo 1 : Cryptosporidies endogènes apparaissant sous la forme de corps basophiles au niveau de l'épithélium de l'iléon d'une chèvre (*Capra hircus*), microscope optique (trait = 50µm)

Photo 2 : Cryptosporidies au niveau de l'épithélium gastrique d'un taïpan (*Oxyuranus scutellatus*), microscopie optique (trait = 50µm)

Photo 3 : Cryptosporidies attachées à la surface de l'épithélium de la trachée d'une caille (*Coturnix coturnix*). Microscope électronique à balayage (trait= 10µm)

Photo 4 : Idem photo 3

Le cycle de développement des cryptosporidies a longtemps été difficile à étudier (Fayer, Morgan *et al.* 2000). Les seuls modèles de développement *in vitro* ont longtemps concerné *C. parvum* et *C. baileyi*. Leur culture était réussie seulement partiellement, puisque sans production d’oocystes (O’Donoghue 1995) et sur une durée limitée de 48 à 72 h (Hijjawi, Meloni *et al.* 2001). Elle était réalisée sur cellules endodermiques de membrane chorioallantoïque d’embryons de poulet (O’Donoghue 1995).

Le développement parasitaire complet a été observé depuis 2001 avec l’utilisation de cellules HCT-8 d’adénocarcinome intestinal humain (Hijjawi, Meloni *et al.* 2001). Le cycle a pu être obtenu entièrement et sur une durée de 25 jours.

Par ailleurs, les modèles animaux ne sont pas faciles à obtenir, notamment les modèles de diarrhée aiguë, en dehors des nouveau-nés souriceaux.

Enfin, les structures intra-parasitaires sont encore très mal connues (**Encadré 5**).

Encadré 5 :

Nos seules connaissances concernant la structure chromosomique des *Cryptosporidium* sont limitées à l’existence de 5 à 6 chromosomes chez *C. parvum* et *C. baileyi* (O’Donoghue 1995), les cryptosporidies étant des espèces haploïdes (Tanriverdi et Widmer 2006).

III.1- Etapes du cycle parasitaire

Suite à l’**ingestion** ou l’**inhalation** (Kosek, Alcantara *et al.* 2001) d’oocystes infectieux, survient le phénomène d’**excystation**.

III.1.1-Excystation et invasion

L’excystation permet la libération des sporozoïtes de l’oocyste contaminant. Ce phénomène est favorisé par les milieux réducteurs, les sels biliaires, les enzymes digestives mais aussi la température (O’Donoghue 1995; Smith, Nichols *et al.*

2005). Le transit digestif rassemble tous les éléments nécessaires au phénomène d'excystation qui peut être provoqué *in vitro* par l'association d'une température adéquate (37°C), d'un pH acide et de sels biliaries. Ces conditions ne semblent pourtant pas complètement indispensables au vu des localisations extra-intestinales observées (Smith, Nichols *et al.* 2005).

L'excystation entraîne la libération de 4 sporozoïtes par une extrémité de l'oocyste présentant une suture pariétale (**Figure 6**) s'étendant sur un tiers à 50% de la longueur de l'oocyste (Smith, Nichols *et al.* 2005) (**Figure 7**).

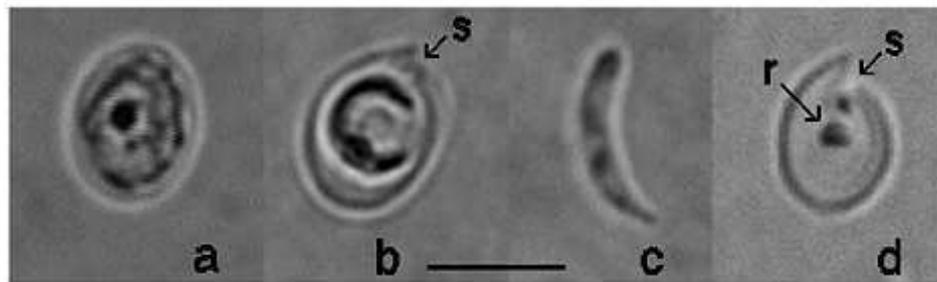


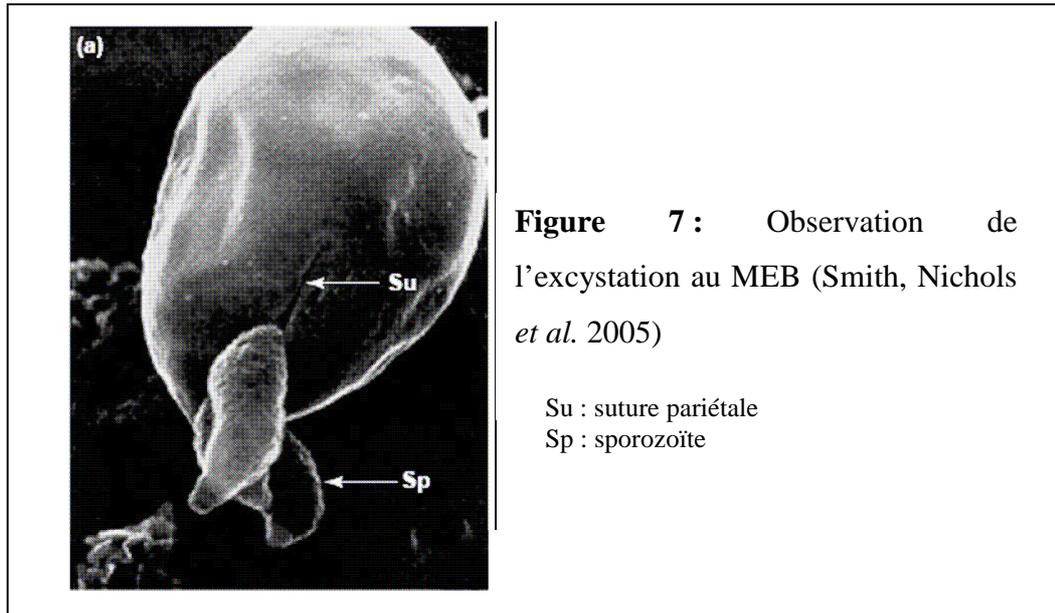
Figure 6: Visualisation *in vitro* sur cellules HCT-8 des phases d'excystation et de libération des sporozoïtes (Hijjawi, Meloni *et al.* 2001)

Observation microscopique des phases d'excystation d'oocystes de *C. parvum* après traitement par trypsine et sels biliaries (trait= 5µm)

- (a) : oocyste à paroi mince intact avant traitement
- (b) : ouverture partielle de la suture (s)
- (c) : sporozoïte libéré
- (d) : coque vide de l'oocyste présentant un résidu (r) et la suture ouverte (s)

La paroi de l'oocyste est constituée d'une couche externe d'environ 10 nm d'épaisseur et d'une couche interne d'environ 5,8 nm (Smith, Nichols *et al.* 2005). Entre les deux se situe un espace d'environ 2,5 nm. Dans la composition de cette paroi semblent intervenir des protéines glycosylées ainsi que des lipides. Elle pourrait être perméable à certaines molécules hydrophiles de faible poids moléculaire dans certaines conditions de température et de pH.

La mise en présence des oocystes avec des protéases entraîne une augmentation importante de la mobilité des sporozoïtes avant même l'excystation, ce qui pourrait montrer une possible transmission de signal intra-oocystique selon un phénomène encore non élucidé.



La protéine COWP (*Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein) jouerait un rôle stabilisateur de la paroi et expliquerait en partie la grande résistance de cette forme de dissémination parasitaire.

La libération des sporozoïtes survient 30 à 90 minutes après induction *in vitro* de l'excystation. Ces sporozoïtes en forme de virgule mesurent 3,8 à 5,2 μm de long pour 0,6 à 1,2 μm de large (Smith, Nichols *et al.* 2005) (**Figure 8**).

Ils orientent rapidement (3,5 minutes *in vitro*) leur pôle antérieur vers la surface apicale des entérocytes du jéjunum terminal et de l'iléon, ou exceptionnellement au niveau de l'épithélium bronchique ou conjonctival (Kosek, Alcantara *et al.* 2001) par un système de microtubules qui leur confère leur mobilité (Smith, Nichols *et al.* 2005).

Suit une phase d'attachement à la cellule entérique d'une durée estimée *in vitro* à 5,5 minutes. L'attachement à la cellule s'effectue *via* des molécules d'adhésion. Elles sont contenues au sein des micronèmes et granules denses dans la région apicale du sporozoïte. Il s'agit des molécules gp900, TRAP-C1, TRAP-C2, gp40, gp 15 (Deng, Rutherford *et al.* 2004), Gal/GalNAc-lectine, CP47, Cpa135, sPLA₂, CSL. Elles se trouvent principalement dans la zone apicale mais peuvent pour certaines (dont gp15) être réparties sur toute la surface du sporozoïte. Certaines de

ces protéines ont un récepteur cellulaire connu comme CP47 qui se lie à p57, protéine très exprimée au niveau des cellules de l'iléon ou encore le CSL avec une protéine cellulaire de 85 kDa (Smith, Nichols *et al.* 2005). Lors de cet attachement à la surface cellulaire est aussi observée une invagination de la membrane cellulaire (Deng, Rutherford *et al.* 2004).

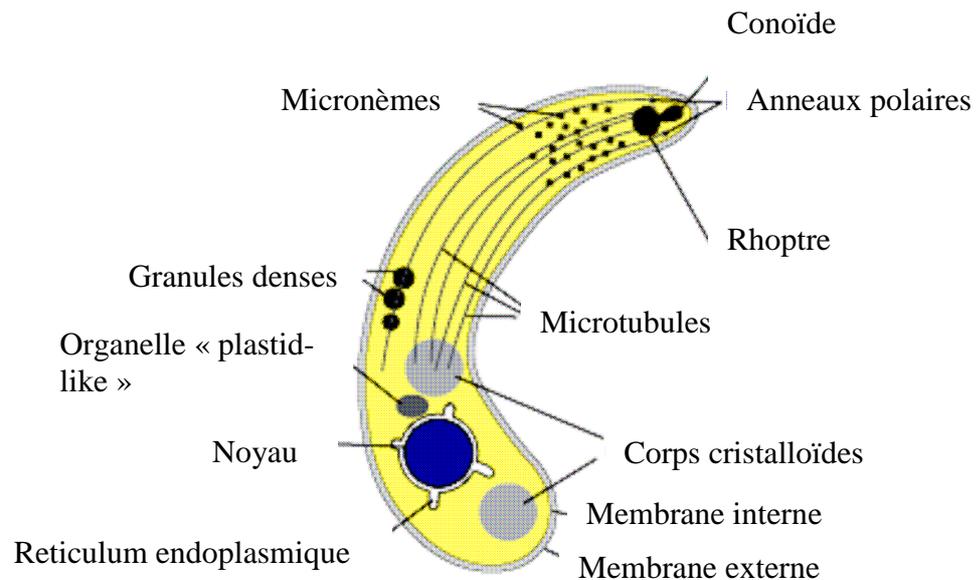


Figure 8 : Représentation d'un sporozoïte (d'après Smith, Nichols *et al.* 2005)

Les sporozoïtes pénètrent ensuite dans les cellules entérocytaires : c'est la phase d'invasion qui débute 8,5 minutes après l'infection de cellules *in vitro* (par comparaison, ce phénomène est observé en 10 à 30 secondes pour *Toxoplasma gondii*). Les membranes cellulaires et parasitaires fusionnent et un réarrangement du cytosquelette cellulaire s'effectue. Nécessaire à la pénétration du parasite, ce phénomène est inhibé par la colchicine et la vinblastine (Chen et LaRusso 2000; Deng, Rutherford *et al.* 2004; Smith, Nichols *et al.* 2005). Cette pénétration semble nécessiter l'activité de sérine protéases, cystéine protéases et arginine aminopeptidases (Smith, Nichols *et al.* 2005) contenues dans l'oocyste. Les protéines sus-citées seraient aussi impliquées dans ce phénomène. Elles expliqueraient en partie la spécificité d'hôte des différentes espèces de

Cryptosporidium en fonction de leur affinité pour les récepteurs cellulaires spécifiques de l'hôte (Hashim, Mulcahy *et al.* 2006).

Le sporozoïte demeure en position extra-cytoplasmique au sein d'une vacuole parasitophore intra-cellulaire. Cette vacuole lui confère une situation privilégiée qui le protège du système immunitaire de l'hôte. Une formation particulière est observée à l'interface entre cette vacuole et la cellule parasitée; elle se matérialise par une bande dense aux électrons dont la composition exacte est encore inconnue. Un réseau d'actine fortement développé est observé en regard du parasite créant un « complexe jonctionnel hôte-parasite » (Elliott et Clark 2000; Deng, Rutherford *et al.* 2004) (**Figure 9**). Son rôle est inconnu mais il pourrait jouer un rôle dans les échanges nutritionnels, la protection ou l'adhésion parasitaire (Carey, Lee *et al.* 2004).

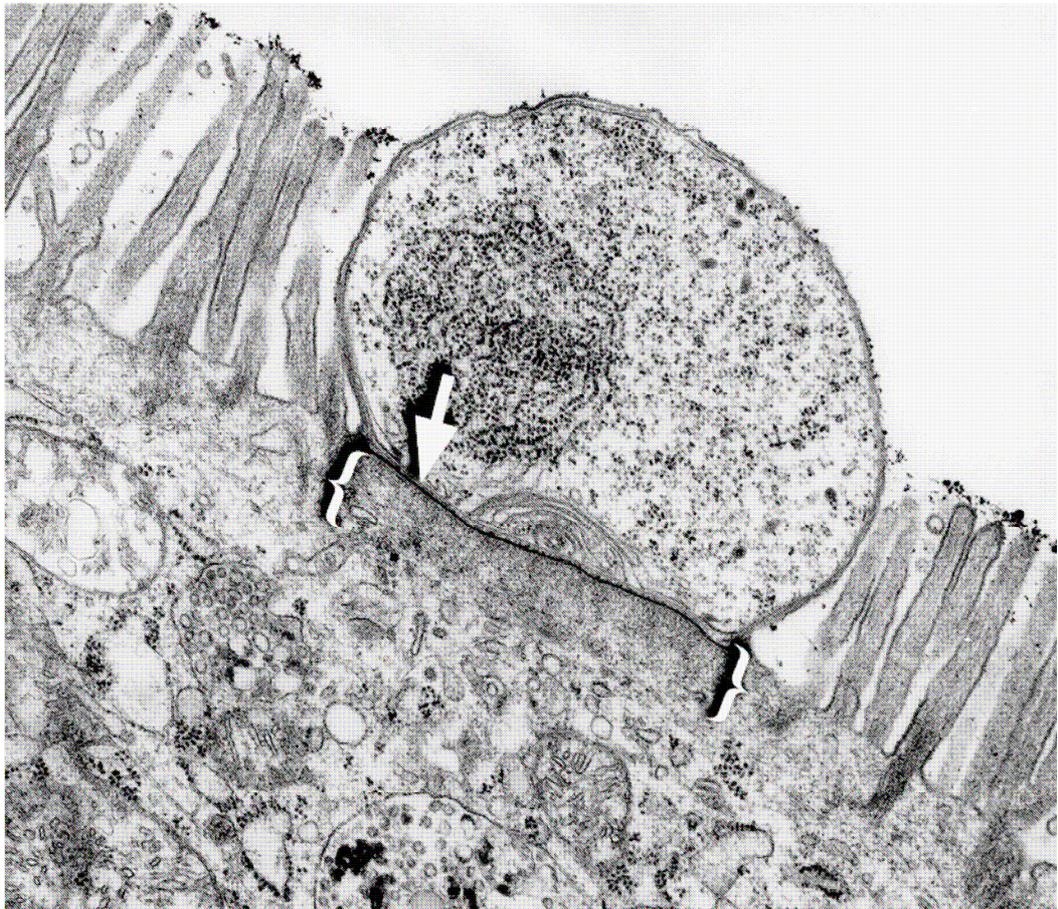


Figure 9 : Photographie par MET d'un entérocyte murin parasité par un *Cryptosporidium*. La bande de jonction (flèche) sépare le parasite du cytoplasme cellulaire. Juste en dessous se trouve un réseau filamenteux composé d'actine (parenthèses) (Elliott et Clark 2000).

III.1.2- Mérogonie ou schizogonie

Suite au développement d'organelles d'attachement et à la sphérisation des sporozoïtes (Smith, Nichols *et al.* 2005), les trophozoïtes ainsi constitués (**Figure 10**) subissent une phase de multiplication asexuée appelée mérogonie (ou schizogonie) par division nucléaire.



Figure 10 : Photographie réalisée par MET de trophozoïtes de *Cryptosporidium* au sein d'une vacuole parasitophore à la surface de l'iléon d'une chèvre. (Trait = 2µm) (O'Donoghue 1995)

On distingue deux types de mérontes (ou schizontes) à l'issue de ce processus:

- ✓ les mérontes de type I. Ils libèrent 6 à 8 mérozoïtes au niveau de la vacuole parasitophore (O'Donoghue 1995; Ramirez, Ward *et al.* 2004) et sont source d'auto-infection car ils envahissent les cellules épithéliales voisines. Ils subissent soit un nouveau cycle de mérogonie de type I ou bien s'engagent dans la mérogonie de type II.
- ✓ les mérontes de type II, libérant 4 mérozoïtes voués à la phase sexuée de la multiplication. Ceux-ci forment des microgamontes d'une part, à l'origine des microgamétocytes producteurs de

microgamètes non flagellés; et des macrogamontes d'autre part, producteurs de macrogamétocytes mononucléés (O'Donoghue 1995) (**Figure 11**).



Figure 11 : Macrogamétocytes de *Cryptosporidium* à la surface de l'épithélium de la bourse d'une caille. (trait= 2 μ m) (O'Donoghue 1995)

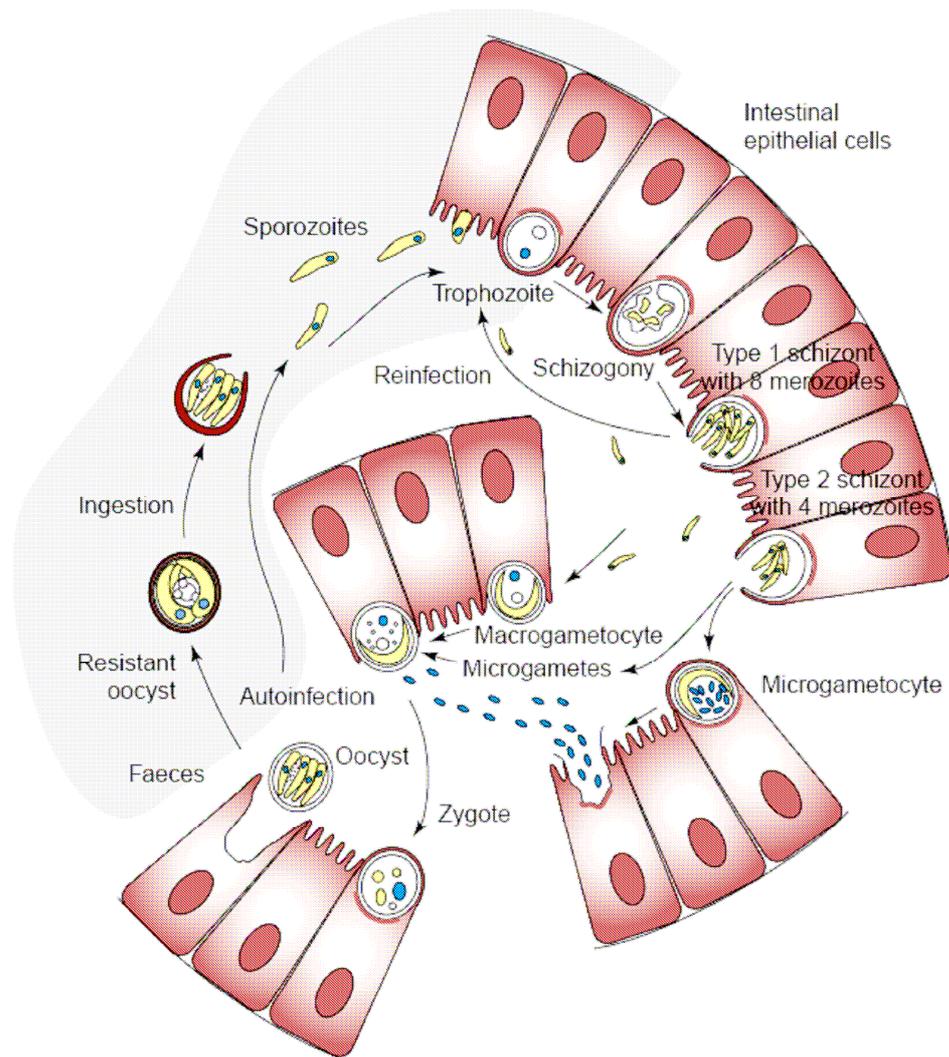
III.1.3- Reproduction sexuée

La production de zygote suit la fécondation d'un macrogamétocyte par un microgamétocyte.

Les oocystes sont produits suite à une phase de sporogonie avec production de quatre sporozoïtes (Okhuysen et Chappell 2002).

III.1.4- Oocystes

Parmi les oocystes produits, 20% sont des formes à paroi mince et 80% des formes à paroi épaisse (Kosek, Alcantara *et al.* 2001). Les premiers peuvent être source d'excystation endogène et expliquer les formes chroniques d'infection ; les seconds sont les formes libérées dans le milieu extérieur, directement infectieuses (O'Donoghue 1995; Xiao, Fayer *et al.* 2004) extrêmement résistantes et à l'origine des contaminations (**Figure 12**).



71

Figure 12 : Cycle de multiplication des cryptosporidies (Smith, Nichols *et al.* 2005)

L'excrétion peut s'élever à 10^8 oocystes par jour ou plus (Carey, Lee *et al.* 2004) pour un humain infecté (Huang, Chappell *et al.* 2004). Elle a été estimée à 10^9 à 10^{10} oocystes pendant une période de 7 à 10 jours chez des veaux infectés expérimentalement par une dose de 10^5 oocystes (Fayer 2004).

Encadré 6 :

Des étapes du cycle parasitaire semblables à celles observées chez les Grégarines ont été observées après infection expérimentale de la souris (Fayer 2004).

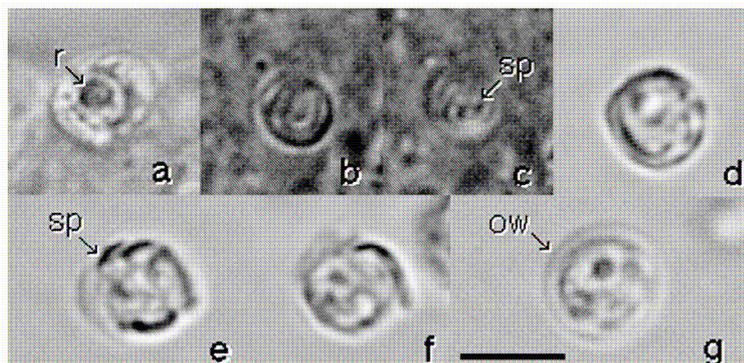


Figure 13 : Photographie d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* obtenus sur cellules HCT-8 ; la première image a été obtenue 72 heures après infection ; (a) Oocyste intracellulaire non sporulé avec résidu (r) ; (b, c) oocyste sporulé avec trois sporozoïtes (sp) ; (d) Oocyste à paroi mince, purifié en gradient de Ficoll au bout de 12 jours de culture ; (e) Oocyste à paroi mince sporulé avec quatre sporozoïtes (sp) et résidu ; (f) excystation d'un sporozoïte à partir d'un oocyste à paroi mince ; (g) oocyste à paroi épaisse après purification de selles d'un humain infecté par *C. parvum* ; on remarquera la présence de la paroi épaisse externe absente des formes à paroi mince en (d). Trait = 5µm. (Hijjawi, Meloni *et al.* 2001)

Voici une vision globale du cycle de multiplication et de propagation des cryptosporidies, et plus particulièrement de *C. parvum* (ancien génotype II ou bovin), mais qui peut être transposée aux autres espèces (**Figure 14**) :

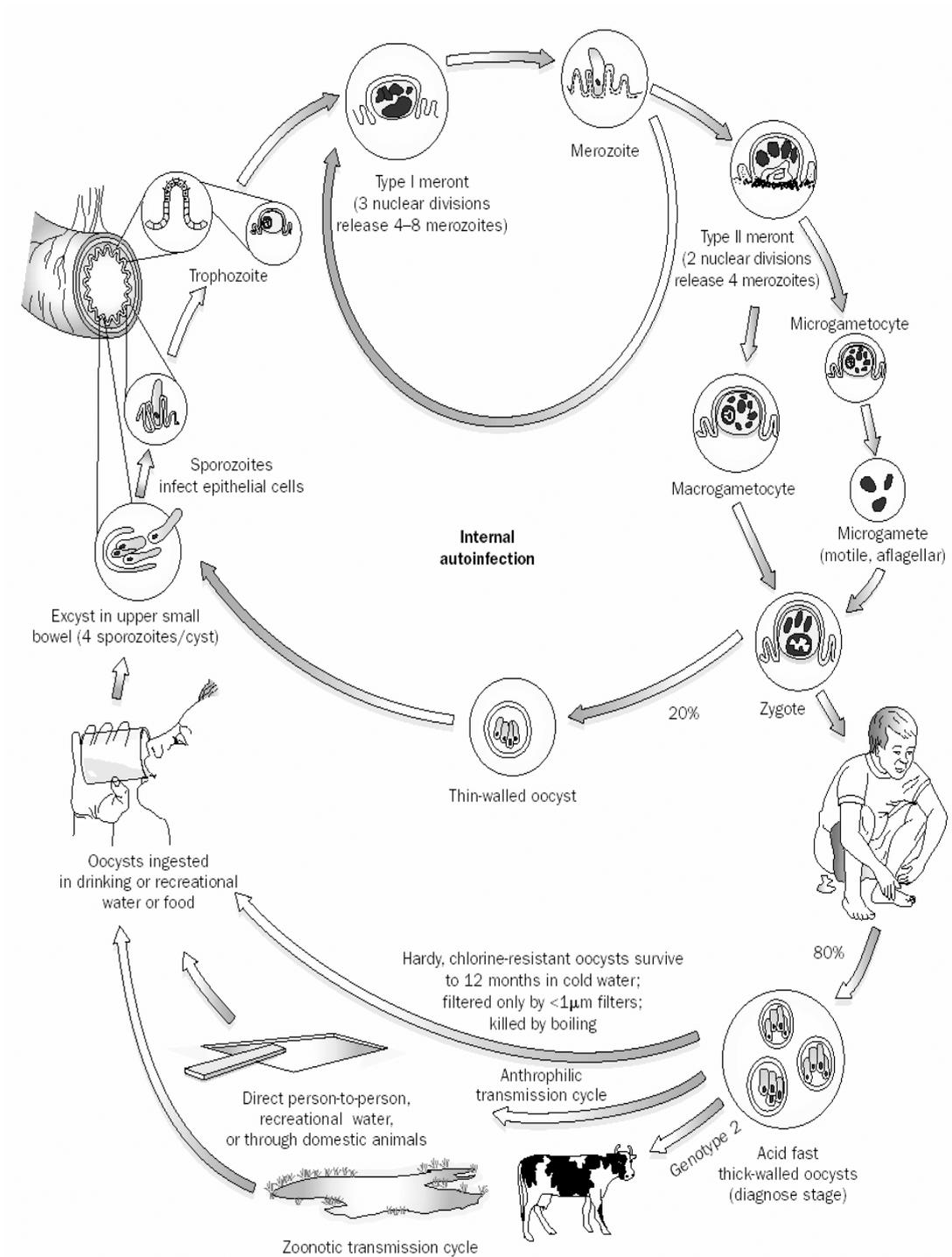


Figure 14: Cycle de transmission et de multiplication de *Cryptosporidium parvum* (Kosek, Alcantara *et al.* 2001)

Les oocystes sont des formes particulièrement résistantes de dissémination parasitaire du genre *Cryptosporidium*. Il a été établi qu'ils pouvaient survivre et rester infectieux plusieurs mois dans les conditions habituelles mais aussi, dans une moindre mesure, à des températures ou dans des conditions plus extrêmes surtout en eau pure (Fayer, Morgan *et al.* 2000; Fayer 2004):

- ✓ au moins 6 mois à 0, 5, 10, 15 ou 20°C (conditions les plus fréquentes)
- ✓ 3 mois à 25-30°C
- ✓ 1 semaine à 35°C
- ✓ 20 minutes à 55 °C
- ✓ 5 minutes à 59,7°C
- ✓ 5 secondes à 71,7°C
- ✓ 2 minutes à -5°C
- ✓ une semaine à -10°C
- ✓ 24 heures à -20°C
- ✓ mort immédiate à -70°C

Ils sont très sensibles à la dessiccation puisqu'ils perdent alors leur pouvoir infectieux en 4 heures.

Ils résistent bien aux conditions de forte salinité car ils conservent leur infectiosité au moins 35 jours dans l'eau de mer à 4°C et 2 semaines dans de l'eau à 30% de salinité (Fayer 2004) (**Tableau IX**).

Ils sont résistants à la plupart des désinfectants utilisés habituellement tels l'eau de javel, l'iode ou les désinfectants usuels. Ainsi, les oocystes résistent pendant au moins 24 heures à un taux de chlore de 10 p.p.m. (par comparaison, le taux est approximativement de 2 p.p.m. en bassin municipal de baignade). L'étude de la viabilité des oocystes par technique de RT-PCR basée sur l'ARNm de la protéine HSP70 montre une viabilité persistante après chloration, contrairement à l'ozone qui paraît plus efficace (Carey, Lee *et al.* 2004). Ils sont également résistants à un certain degré d'acidité (épidémies liées à l'absorption de cidre contaminé).

III.2- Variations observées en fonction des espèces de *Cryptosporidium*

III.2.1- Sites de multiplication

Comme nous l'avons mentionné au début de ce mémoire, les différentes espèces de cryptosporidies ne présentent pas la même affinité tissulaire pour mener à bien leur cycle de multiplication (**Tableau X**).

Paramètres	Conditions	Viabilité des oocystes
Température	336h dans de l'eau à 10°C et jusqu'à 30°C	Oui
	1 minute à plus de 72,4°C pendant 2 minutes ou plus longtemps à 64,2°C	Non
	5 minutes à 59,7°C	Diminution
	21h à -22°C	67% de mortalité
	152h à -22°C	>90% de mortalité
	Congélation brutale	100% de mortalité
Dessiccation	4h à température ambiante	>99% de mortalité
Eau stérile	>12 semaines à -4°C ou +4°C	Oui
Eau du robinet	176 jours dans un système de flux en laboratoire à température ambiante	96% de mortalité
Eau de rivière	176 jours à température ambiante	94% de mortalité
	-20°C pendant 1 semaine	Non
	14 semaines à 4°C ou 10°C	Oui
	12 semaines à 21-23°C	99.999% de mortalité
Eau de mer	35 jours à 4°C en laboratoire	38% de mortalité
	Salinité de 10, 20 et 30 p.p.t. à 10°C dans l'eau salée et 10 p.p.t. à 20°C pendant 12 semaines dans des huîtres	Oui
Selles de vaches	176 jours à température ambiante	66% de mortalité
Selles humaines	178 jours à 4°C	78% de mortalité

Tableau IX : Effet de différents facteurs environnementaux sur la survie et l'infectiosité des oocystes (d'après Carey, Lee *et al.* 2004)

Espèces	Hôte	Site de prédilection de l'infection
<i>C. parvum</i>	Mammifères	Intestin
<i>C. muris</i>	Mammifères	Estomac
<i>C. meleagridis</i>	Oiseaux	Intestin
<i>C. baileyi</i>	Oiseaux	Bourse de Fabricius, cloaque, trachée
<i>C. serpentis</i>	Reptiles	Estomac
<i>C. nasorum</i>	Poissons	Intestin, estomac

Tableau X: Exemples de sites d'infection en fonction de différentes espèces de cryptosporidies (d'après O'Donoghue 1995)

III.3- Durée du cycle parasitaire

La période pré-patente correspond au laps de temps entre l'ingestion d'oocystes et leur excrétion faisant suite à un cycle complet de développement.

Même si un cycle complet est apparu possible en l'espace de 48 heures, il nécessite en général au moins 3 à 5 jours et jusqu'à 2 semaines (Fayer 2004), soit globalement de 2 à 14 jours pour la plupart des espèces animales domestiques (O'Donoghue 1995).

La période patente représente la durée durant laquelle sont excrétés les oocystes avant que l'infection ne soit maîtrisée par le système immunitaire de l'hôte.

Elle peut présenter des variations importantes en fonction des individus : de quelques jours à quelques mois avec une durée médiane de 9 à 15 jours (Ramirez, Ward *et al.* 2004).

Pour résumer :

Chez l'individu immunocompétent, les cryptosporidies sont des parasites des cellules entérocytaires ou stomacales. L'ingestion d'oocystes inaugure le cycle de multiplication parasitaire.

L'excystation est suivie d'une phase d'invasion cellulaire par les sporozoïtes. Une vacuole parasitophore de localisation originale (intracellulaire mais extra-cytoplasmique) est formée. Puis le cycle se poursuit pour aboutir à la formation d'oocystes.

Ces formes de résistance se caractérisent par leur caractère directement infectieux et leur aptitude à résister aux conditions extérieures habituelles. Elles possèdent aussi une grande résistance vis-à-vis des désinfectants classiquement utilisés dans les processus de décontamination de l'eau potable.

La structure interne de ces parasites demeure très mal connue à l'heure actuelle.

**DEUXIEME PARTIE :
LA CRYPTOSPORIDIOSE
HUMAINE**

I- EPIDEMIOLOGIE

Aujourd'hui décrite chez l'homme dès l'âge de trois jours et jusqu'à 95 ans (Fayer 2004; Centers for Disease Control and Prevention 1997), dans plus de 90 pays (Fayer, Morgan *et al.* 2000) et sur les six continents (Kosek, Alcantara *et al.* 2001), les deux premiers cas de cryptosporidiose humaine ont seulement été rapportés en 1976 (Nime, Burek *et al.* 1976; O'Donoghue 1995).

C'est suite à la pandémie de S.I.D.A. que la cryptosporidiose a été reconnue comme une pathologie digne d'intérêt. Mais on sait aujourd'hui que l'immunodépression n'est pas un pré-requis obligatoire et que nombre de cas concernent aussi les individus immunocompétents.

On estime entre 250 millions et 500 millions par an le nombre d'individus infectés par ce parasite (Hu, Tong *et al.* 2007).

I.1- Généralités

La cryptosporidiose touche tous les pays, qu'ils soient dits développés ou non, avec une plus forte prévalence dans la population pédiatrique (Xiao, Fayer *et al.* 2004) qui constitue, avec les immunodéprimés, le principal groupe à risque.

Les études de séroprévalence confirment la présence ubiquitaire de cette parasitose (Kosek, Alcantara *et al.* 2001), puisqu'on constate des taux de 20 à 35 % de séropositivité chez les jeunes adultes aux USA (DuPont, Chappell *et al.* 1995; Kosek, Alcantara *et al.* 2001; Huang, Chappell *et al.* 2004). Compte tenu des conditions d'hygiène moins favorables, les taux sont nettement plus élevés dans les pays en voie de développement tels que la Chine (75% des 11 à 13 ans), ou le Brésil (90% à l'âge de 1 an) (Kosek, Alcantara *et al.* 2001). Les taux peuvent même y approcher les 100% (DuPont, Chappell *et al.* 1995).

Par ailleurs, les cas sont probablement sous-estimés de façon générale car les infections asymptomatiques semblent fréquentes.

Enfin, peu d'obstacles s'opposent à la dissémination parasitaire et à la forte prévalence de l'infection : les formes contaminantes (oocystes) sont de faible taille, très résistantes en milieu extérieur, directement infectieuses, la DI_{50} semble faible et il existe un réservoir animal difficilement maîtrisable. Tout est donc réuni pour en favoriser la dissémination rapide et étendue.

L'humidité et la forte température semblent également être des facteurs favorisant la dissémination des oocystes au sein de la population (Hu *et al.* 2007) avec augmentation de la prévalence de l'infection (Newman, Sears *et al.* 1999).

Au Royaume-Uni, on remarque que les épidémies de cryptosporidiose surviennent selon une évolution bimodale avec deux pics d'incidence, le premier au printemps lié à *C. parvum*, le second à la fin de l'été lié aux deux espèces *C. parvum* et *C. hominis* (Caccio, Thompson *et al.* 2005).

I.2- Sources de contaminations humaines

La contamination s'effectue le plus souvent par ingestion d'oocystes contaminants, bien que des cas d'infection par inhalation responsables de symptômes pulmonaires chez les enfants et les immunodéprimés aient été rapportés (Fayer, Morgan *et al.* 2000; Ramirez, Ward *et al.* 2004).

Différentes sources de contamination ont été recensées et sont résumées dans la **figure 15**.

Les facteurs de risque sont exposés en **Annexe 4** et apparaissent divergents sur certains points. Les points de convergence les plus clairs en la matière sont les contacts avec d'autres cas humains ou animaux, les voyages à l'étranger et le contact avec le bétail (Hunter et Thompson 2005). L'ingestion de végétaux crus est associée de façon significative à un moindre risque de cryptosporidiose. L'explication provient vraisemblablement du rôle protecteur de contacts faibles et répétés avec des cryptosporidies, entraînant une stimulation régulière et protectrice du système immunitaire.

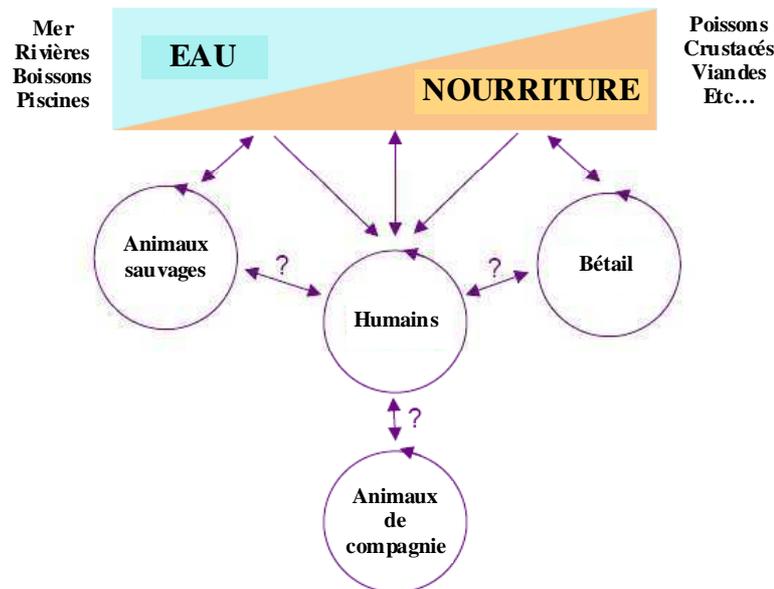


Figure 15: Diagramme montrant les différents cycles de transmission des cryptosporidies. L'eau et la nourriture jouent, à côté de la transmission directe, un rôle important ; les points d'interrogation indiquent l'absence de données concernant les interactions entre les différents cycles (d'après Hunter et Thompson 2005).

I.2.1- Aliments

Malgré la faible association des aliments avec le risque de cryptosporidiose, ceux-ci peuvent être impliqués dans des contaminations humaines car des oocystes peuvent s'y trouver en quantité importante (**Encadré 7**). 10% des cas de cryptosporidiose aux USA sont probablement d'origine alimentaire, entraînant environ 700 hospitalisations par an (Smith, Caccio *et al.* 2006).

Les aliments contaminés peuvent être liquides comme le cidre (épidémie du Maine, USA en 1993) ou le lait mal pasteurisé (Ramirez, Ward *et al.* 2004).

Il peut aussi s'agir d'aliments solides tels que la salade (épidémie du Minnesota, USA), d'oignons (Washington, USA), de fruits (Dillingham, Lima *et al.* 2002), et même s'intégrer dans le cadre d'une toxi-infection alimentaire collective (T.I.A.C.) (Quiroz, Bern *et al.* 2000). Le rôle des fruits de mer et notamment des bivalves filtrants (moules, huîtres ...) consommés crus pourrait ne pas être à négliger (Carey, Lee *et al.* 2004).

Encadré 7 (Smith, Caccio et al. 2006) :

Les différents modes de contamination de la nourriture sont les suivants :

- ✓ Utilisation de selles contaminées comme fumier et fertilisant
- ✓ Cultures à proximité d'élevages
- ✓ Défécation d'animaux sauvages sur des cultures
- ✓ Contamination directe de la nourriture par des animaux vecteurs tels que oiseaux et insectes
- ✓ Irrigation avec de l'eau contaminée
- ✓ Aérosolisation de produits phytosanitaires contaminés
- ✓ Aérosolisation lors de l'épandage de fumier
- ✓ Hygiène défectueuse des ramasseurs et cueilleurs
- ✓ Lavage des aliments avec de l'eau contaminée
- ✓ Utilisation d'eau contaminée pour la production de glaçons ou de glaces
- ✓ Utilisation d'eau contaminée dans des produits recevant un traitement minimum de conservation
- ✓ Ingestion d'oocystes à partir de nourriture consommée crue ou à partir de coquillages ayant accumulé des oocystes infectieux
- ✓ Contamination de la viande à partir du contenu digestif des animaux lors de l'abattage

I.2.2- Eau

C'est le mode de contamination qui semble le plus courant. Il peut s'agir d'eau de surface (étang, lac), d'eau de puits contaminé, mais également d'eau de distribution publique. Les contaminations humaines liées à l'eau de loisir (piscine, jacuzzi, fontaines) ont ainsi été jugées responsables aux USA de plus de 10 000 cas de cryptosporidioses en 12 ans (Fayer, Morgan *et al.* 2000; Fayer 2004). Quant à l'eau de consommation publique, elle est également mise en cause dans de nombreuses épidémies. Il faut dire que les oocystes de cryptosporidies sont

particulièrement résistants aux désinfectants et aux méthodes de purification classiques (chlore, micro-filtration supérieure à 1 µm).

L'eau de mer est aussi susceptible de contenir des oocystes, notamment à proximité des zones de déversement d'eaux usées plus ou moins bien traitées ou suite à d'abondantes précipitations.

Concernant les infections à protozoaires liées à l'absorption d'eau, les cryptosporidies semblent se partager la première place avec *Giardia intestinalis* (Karanis, Kourenti *et al.* 2007) (**Encadré 8**).

Encadré 8 :

Sur 325 épidémies infectieuses liées à la consommation d'eau par des protozoaires, l'étiologie parasitaire a montré (Karanis, Kourenti *et al.* 2007) la présence de :

- ✓ *Cryptosporidium sp.* (50,8 %)
- ✓ *Giardia lamblia* (40,6 %)
- ✓ *Entamoeba histolytica* (2,8%)
- ✓ *Cyclospora cayetanensis* (1,8%)
- ✓ *Toxoplasma gondii* (0,9%)
- ✓ *Isoospora belli* (0,9%)
- ✓ *Blastocystis hominis* (0,6%)
- ✓ *Balantidium coli*, *Microsporidium sp.*, *Acanthamoeba* et *Naegleria* (0,3% chacune)

Cette publication est à prendre avec précaution puisque réalisée sur 325 épidémies dont 93% recensées en Europe et Amérique du Nord. Ces données ne sont certainement pas transposables aux pays en voie de développement ne possédant pas les mêmes structures et mêmes législations de traitement de l'eau de consommation.

Dans le même ordre d'idées, 71% des épidémies liées à l'eau en 1993 et 1994 aux USA ont été attribuées à *C. parvum* et *G. lamblia* (Carey, Lee *et al.* 2004).

Pour résumer, cryptosporidies et *Giardia* sont considérés comme les deux protozoaires les plus impliqués dans les diarrhées d'origine parasitaire (Caccio, Thompson *et al.* 2005).

I.2.3- Contamination par les animaux

I.2.3.a- Animaux excréteurs

Il s'agit d'animaux parasités par des cryptosporidies, notamment dans les exploitations agricoles. La plupart des épidémies liées à l'absorption d'eau contaminée par des *C. parvum* s'expliquent d'ailleurs par la proximité d'élevages parasités. En effet, un seul animal contaminé excrète des quantités très importantes d'oocystes et peut représenter à lui seul un risque important de contamination.

Les animaux de compagnie pourraient également être incriminés même si les voies de contamination n'ont pas été formellement démontrées à ce jour (Hunter et Thompson 2005). En effet, chiens, chats et oiseaux peuvent être porteurs d'espèces potentiellement pathogènes pour l'homme : *C. felis*, *C. canis* et *C. meleagridis* respectivement, les oiseaux pouvant être également porteurs de *C. parvum*. La proximité de ces animaux de compagnie dans l'entourage des Hommes en font des sources probables de contamination humaine. Une seule étude aurait montré un risque accru de cryptosporidiose chez les patients V.I.H. possédant un chien (et non d'autres animaux) (Hunter and Thompson 2005).

I.2.3.b- Animaux vecteurs

Des animaux et en particulier des insectes peuvent favoriser le transport d'oocystes au sein de l'environnement humain. Il a été démontré (Graczyk, Fayer *et al.* 2000) que les mouches pouvaient jouer le rôle de vecteurs jusqu'à 3 semaines après un contact infectieux et porter jusqu'à une centaine d'oocystes pour un seul individu !

Les insectes comme les blattes (Dillingham, Lima *et al.* 2002) ou les fourmis pourraient jouer un rôle similaire.

En raison de leur rôle filtrant, les bivalves peuvent être considérés comme des animaux vecteurs (Fayer 2004), les cryptosporidies n'étant pas nuisibles pour ces organismes.

I.2.4- Contaminations inter-humaines

Elles peuvent être facilitées par la promiscuité, ce qui est notamment le cas au sein d'institutions de personnes âgées ou pédiatriques (Xiao, Fayer *et al.* 2004), mais également à l'hôpital où les cas peuvent être nosocomiaux. Une épidémie a ainsi été décrite dans une unité de transplantation de moelle osseuse (Hunter et Nichols 2002), le diagnostic différentiel clinique avec les épidémies à *Clostridium difficile* n'étant pas évident de prime abord.

Il est également évoqué une transmission par voie sexuelle, plus particulièrement chez les homosexuels (O'Donoghue 1995; Fayer, Morgan *et al.* 2000; Ramirez, Ward *et al.* 2004; Hunter et Thompson 2005).

I.3- Doses infectieuses chez l'Homme

I.3.1- DI₅₀ pour *C. parvum*

L'expérience a été réalisée chez 29 volontaires sains séronégatifs vis à vis des cryptosporidies et à partir d'oocystes de *C. parvum* (DuPont, Chappell *et al.* 1995). Les doses administrées se situaient entre 30 et 1 million d'oocystes. Les patients ont été surveillés pendant 8 semaines.

Parmi les 5 individus ayant reçu 30 oocystes, 20% ont été infectés. Parmi les 8 individus ayant reçu 100 oocystes, 37,5% ont été atteints (McLauchlin, Amar *et al.* 2000). 88 % des 16 patients restants ayant ingéré 300 ou plus oocystes ont été atteints, dont 100 % des 7 individus ayant reçu plus de 1 000 oocystes. 61% des sujets infectés ont déclaré des symptômes digestifs et 39% des manifestations diarrhéiques (**Tableau XI**).

La DI₅₀ a été calculée par régression linéaire et a été établie à 132 oocystes, soit des valeurs comparables à celles observées pour le parasite *Giardia intestinalis*.

Ce qui est remarquable est l'absence de différences significatives des durées d'incubation (moyenne de 9 jours) et de maladie (moyenne de 6,5 jours) en fonction des doses ingérées.

Nombre d'oocystes ingérés	Nombre de sujets	Nombre d'infections (excrétion d'oocystes)	Nombre de manifestations digestives	Nombre de cryptosporidioses cliniques (diarrhées)
30	5	1 (20%)	0	0
100	8	3 (37.5%)	3 (37.5%)	3 (37.5%)
300	3	2 (66.7%)	0	0
500	6	5 (83.3%)	3 (50%)	2 (33.2%)
>1000*	7	7 (100%)	5 (71.5%)	2 (37.6%)
Total	29	18	11	7

Tableau XI : Taux d'infections, de manifestations digestives et de cryptosporidioses cliniques en fonction du nombre d'oocystes ingérés chez 29 volontaires sains (d'après DuPont, Chappell *et al.* 1995).

* : 1 000 oocystes chez 2 sujets, 10 000 oocystes chez 3 sujets, 100 000 chez un sujet et 1 000 000 chez le dernier.

Une DI_{50} recalculée plus récemment (Fayer, Morgan *et al.* 2000) a été établie à 87 oocystes mais avec la notion de différences entre les souches utilisées.

I.3.2- DI_{50} pour *C. hominis*

L'expérience a été réalisée récemment (Chappell, Okhuysen *et al.* 2006) sur 21 adultes sains. La DI_{50} a été établie entre 10 et 83 oocystes. 40% des sujets ayant reçu une dose de 10 oocystes ont eu des troubles gastro-intestinaux et 75 % de ceux en ayant reçu 500.

L'extrapolation mathématique basée sur la plus grosse épidémie de cryptosporidiose aux USA semble montrer que l'ingestion d'un seul oocyste ait pu suffire à déclencher la maladie (Carey, Lee *et al.* 2004).

I.4- Epidémiologie des cas sporadiques de cryptosporidiose humaine

De façon générale, on dénombre plus de cas sporadiques que de cas liés à des épidémies. Celles-ci ne rendent compte que de 10% des cas totaux de cryptosporidioses aux USA (Feltus, Giddings *et al.* 2006).

Les cas sporadiques semblent plus souvent liés à *C. parvum* comme l'a montré une étude menée en 2000 au Royaume Uni sur 1 705 isolats issus de selles humaines (61,5% de *C. parvum*, 37,5% de *C. hominis* et 1% de *C. meleagridis*). On observe cependant une variation entre l'Europe et l'Amérique où semble prédominer *C. hominis*.

Quant à la prévalence de l'infection, les résultats publiés en 1990 (Fayer 2004) montre des chiffres de 2,6 à 21,3% sur le continent africain, 3,5 à 31,5 % en Amérique du sud et Amérique centrale, 1,3 à 13,1% en Asie, 0,1 à 14,1% en Europe et 0,3 à 4,3% en Amérique du Nord.

I.4.1- Population immunocompétente

La population pédiatrique semble constituer le groupe le plus à risque de cryptosporidiose, aux côtés de celui des immunodéprimés.

Une étude indienne (Nagamani, Pavuluri *et al.* 2007) menée sur 681 enfants et 804 adultes diarrhéiques a montré une prévalence de l'infection à *Cryptosporidium* de 7,6% et 0,9% respectivement. On retrouve donc ici la parfaite démonstration de la plus forte sensibilité des enfants vis à vis de ce parasite. Le groupe d'enfants âgés de 6 mois à un an est apparu comme le plus à risque avec une prévalence de 14,3% (**Tableau XII**). Cela recoupe les données générales désignant les enfants de moins de 2 ans comme groupe le plus à risque (Xiao, Fayer *et al.* 2004; Gay-Andrieu *et al.* 2007).

Les espèces les plus fréquemment retrouvées dans cette étude ont été *C. hominis* (69% des cas) puis *C. parvum* (19%) mais aussi des infections mixtes (12%).

De façon générale, les études européennes semblent montrer une plus forte prévalence de *C. parvum* par rapport à *C. hominis* et les études américaines ou asiatiques une plus forte prévalence de *C. hominis*.

Répartition des patients infectés par <i>Cryptosporidium</i>		
Age	Nombre de patients avec diarrhée	Nombre (et pourcentage) de cas positifs à <i>Cryptosporidium</i>
0-6 mois	264	16 (6.1%)
6 mois-1 an	105	15 (14.3%)
1 à 2 ans	93	8 (8.6%)
2 à 5 ans	117	8 (8.6%)
5 à 12 ans	102	5 (4.9%)
>12 ans	804	7 (0.9%)

Tableau XII : Prévalence des infections à *Cryptosporidium* en fonction de l'âge dans l'étude (Nagamani, Pavuluri *et al.* 2007)

Les raisons faisant des enfants de moins de 2 ans et de plus de six mois un groupe à risque sont essentiellement les contacts plus nombreux avec l'environnement et la perte des anticorps maternels (Nagamani, Pavuluri *et al.* 2007).

Les enfants ne sont pas seulement contaminés par les deux espèces *C. hominis* et *C. parvum*. La première étude montrant que l'on pouvait retrouver les espèces *C. felis*, *canis* et *meleagridis* chez des immunocompétents a justement été réalisée chez des enfants au Pérou (Xiao, Bern *et al.* 2001).

132 selles issues de 80 enfants péruviens suivis sur 3 ans ont été analysées. Elles correspondaient à 85 épisodes infectieux de cryptosporidiose dont 29% se traduisant par un syndrome diarrhéique. Cinq espèces de *Cryptosporidium* différentes y ont été retrouvées par technique R.F.L.P. (Restriction Fragment Length Polymorphism) : *C. hominis* (67 cas), *C. parvum* (8 cas), *C. canis* (2 cas), *C. meleagridis* (7 cas) et *C. felis* (1 cas). Les 8 enfants chez lesquels ont été retrouvées les espèces atypiques se sont révélés séronégatifs vis-à-vis du V.I.H.

Il a également été noté la succession d'infections par des espèces identiques ou non (**Figure 16**), évoquant l'absence ou l'inefficacité de la réponse immunitaire dans cette population.

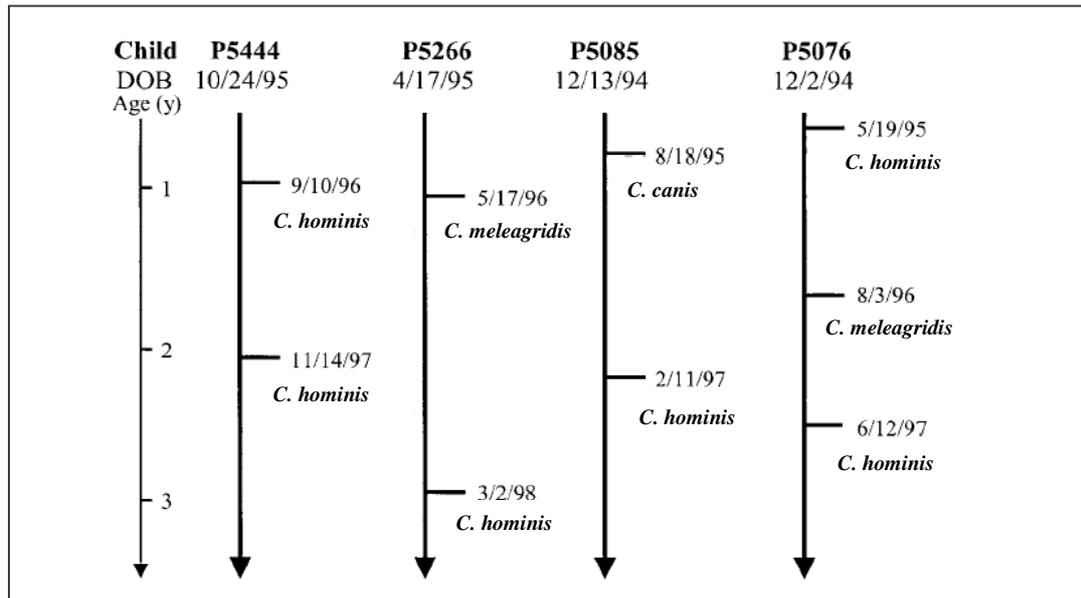


Figure 16: Infections successives de quatre enfants péruviens (DOB : Date of birth) lors de l'étude (Xiao, Bern *et al.* 2001)

I.4.2- Population immunodéprimée

Comme nous venons de le voir, l'immunodépression n'est pas un pré-requis obligatoire à l'infection par les cryptosporidies. Elle en est tout de même une cause favorisante, surtout dans la population adulte. Les immunodépressions concernées sont surtout induites par la répllication du virus du S.I.D.A. mais d'autres types d'immunodépressions, innées ou acquises, peuvent aussi être impliquées.

En 1986, et donc avant l'avènement de thérapeutiques antirétrovirales efficaces, le C.D.C. estimait la prévalence de la cryptosporidiose à 3,6% parmi 19 817 cas de S.I.D.A., avec un taux de décès de 61% liés directement ou non à la cryptosporidiose (Fayer 2004).

Globalement, on remarquera une plus forte prévalence des espèces non *parvum* non *hominis* chez les patients immunodéprimés par rapport aux patients sains. Ainsi, 83% des souches de *C. felis* sont isolées de patients V.I.H. (Raccurt 2007).

La première description de *C. felis* chez un immunodéprimé de type VIH remonte à 1999 (Pieniazek, Bornay-Llinares *et al.* 1999).

Les études ne semblent pourtant pas montrer de différences significatives de prévalence des différentes espèces de cryptosporidies entre la population pédiatrique et les patients porteurs du V.I.H. (**Tableaux XIII et XIV**)

Lieux des études	Patients	Nombre total de patients	Pourcentage de patients infectés par				
			<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. canis</i>
Portugal	V.I.H.+	29	24	55	10.5	10.5	0
Suisse	V.I.H.+	13	15.5	54	7.5	23	0
France	V.I.H.+	46	30.5	48	6.5	13	0
Thaïlande	V.I.H.+	29	83	0	10.5	3.5	0
Thaïlande	V.I.H.+	34	50	15	20.5	8.5	6
Atlanta	V.I.H.+	10	50	10	0	30	10
Nouvelle-Orléans	V.I.H.+	29	62	27.5	0	10.5	0
Pérou	V.I.H.+	118	64.5	17	8.5	3.5	7.5
Pérou	Enfants	83	78.5	9.5	8.5	1	2.5
Kenya	Tous	33	69.5	24	3	0	0
Japon	Tous	22	73	13.5	13.5	0	0

Tableau XIII : Prévalence de cinq *Cryptosporidium sp.* communs chez les humains en fonction des statuts immunitaires et des lieux d'études (d'après Xiao, Fayer *et al.* 2004)

Lieux d'étude	Patients	Nombre d'infections causées par			
		<i>C. meleagridis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. canis</i>	<i>C. muris</i>
USA	V.I.H.+		3	1	
Suisse	V.I.H.+	1	3		
Kenya	V.I.H.+	1			
USA	V.I.H.+		3		
Indonésie	Enfants immunocompétents				2
Angleterre	Patients immunocompétents	6			
Pérou	Enfants immunocompétents	7	1	2	
France	Patients immunodéprimés	3	6		1

Tableau XIV : Cas de cryptosporidies à espèces autres que *C. parvum* et *hominis* ayant fait l'objet d'études (d'après Guyot, Follet-Dumoulin *et al.* 2001)

Les cryptosporidioses représenteraient de 10 à 20% des cas de diarrhées chez les patients V.I.H. dans les pays développés et jusqu'à 50% dans les pays sous-développés (Navin, Weber *et al.* 1999; Morgan, Weber *et al.* 2000).

Une étude menée en 2000 (Morgan, Weber *et al.* 2000) dans une population V.I.H. en Suisse, au Kenya et aux USA montre une répartition entre le groupe majeur constitué de *C. hominis* et *C. parvum* (64 %), et les infections à *C. felis* (27%). La moitié de ces cas seulement possède un animal de compagnie. Un individu a été décrit porteur de *C. felis* à 2 reprises mais à 5,5 mois d'intervalle et sans interruption de la diarrhée durant cet intervalle. Seuls 9 % d'infections à *C. meleagridis* ont été recensées.

Une autre étude (Guyot, Follet-Dumoulin *et al.* 2001) a été menée en 2001 sur le territoire français. Elle portait sur 57 patients dont 11 immunocompétents et 46 immunodéprimés. Parmi ces immunodéprimés ont été recensés 35 patients séropositifs pour le V.I.H. et 11 autres patients présentant d'autres causes d'immunodépression tels que hypogammaglobulinémie ou lymphome. Les résultats sont présentés ci-dessous et page suivante (**Figure 17 et tableau XV**).

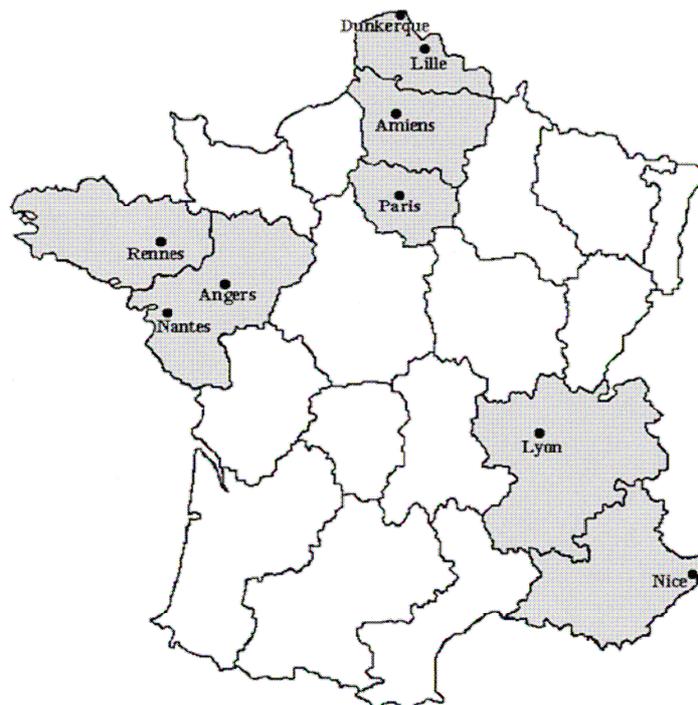


Figure 17: Carte présentant les différentes régions d'isolement des cryptosporidies dans l'étude de Guyot, Follet-Dumoulin *et al.* 2001

Région	Espèces	Patients immuno-compétents	Patients V.I.H.	Patients non V.I.H. immunodéprimés	Total
Nord	<i>C. parvum</i>	6	6	4	16
	<i>C. hominis</i>	3	10	2	15
	<i>C. felis</i>	-	4	1	5
	<i>C. meleagridis</i>	-	2	-	2
Ouest	<i>C. parvum</i>	-	5	-	5
	<i>C. hominis</i>	-	-	-	-
	<i>C. felis</i>	-	1	-	1
	<i>C. meleagridis</i>	-	-	1	1
Sud-est	<i>C. parvum</i>	1	4	3	8
	<i>C. hominis</i>	1	2	-	3
	<i>C. felis</i>	-	-	-	-
	<i>C. meleagridis</i>	-	-	-	-
	<i>C. muris</i>	-	1	-	1
Total	<i>C. parvum</i>	7	15	7	29
	<i>C. hominis</i>	4	12	2	18
	<i>C. felis</i>	-	5	1	6
	<i>C. meleagridis</i>	-	2	1	3
	<i>C. muris</i>	-	1	-	1

Tableau XV: Données concernant les espèces de *Cryptosporidium* isolées en fonction du statut immunitaire des patients en France d'après l'étude de Guyot, Follet-Dumoulin *et al.* 2001

Il ressort de cette étude que tous les cas de *C. non parvum non hominis* ont été isolés chez les patients immunodéprimés (3 cas pour *C. meleagridis*, 6 cas pour *C. felis*, 1 cas pour *C. muris*). Parmi les 8 patients V.I.H. + concernés, 5 avaient moins de 100 lymphocytes CD4 par μL . L'un d'eux infecté par *C. felis* en avait 300 par μL ; le statut immunitaire des deux autres patients n'était pas connu.

Toujours est-il que l'on retrouve dans cette étude menée en France la forte représentation des espèces autres que *C. parvum* et *C. hominis* dans la population immunodéprimée, qu'elle soit V.I.H. ou non.

I.5- Epidémiologie des épidémies de cryptosporidiose

Les épidémies de cryptosporidiose sont pour la plupart liées à l'eau sous toutes ses formes. 49 épidémies liées à l'eau potable ont été recensées entre 1984 et 1999 (Fayer 2004) et 31 liées à l'eau de loisir. La liste la plus récente des épidémies liées à l'eau et aux aliments est exposée en **annexe 5** (Fayer, Morgan *et al.* 2000).

De nombreux facteurs expliquent l'importance de la transmission liée à l'eau : les oocystes sont excrétés en très grand nombre, sont très résistants aux conditions habituelles, la dose infectieuse est faible, ils survivent aux traitements de l'eau usuels et pénètrent à travers les filtres à sable ; enfin, les sources de contamination sont multiples et le réservoir zoonotique est important.

Les épidémies de cryptosporidiose ont surtout été étudiées en Grande-Bretagne aux USA et au Canada où il ressort deux espèces très majoritairement (exclusivement ?) impliquées : *C. parvum* et *C. hominis* (**Tableau XVI**).

Année et lieu	Nombre de cas (nombre d'isolats identifiés)	Espèce identifiée	Source de contamination
1993 Wisconsin, USA	403 000 (5)	<i>C. hominis</i>	Eau de lac
1994, Angleterre	224 (8)	<i>C. hominis</i>	Eau de rivière
1995, Sud-ouest Devon, Angleterre	575 (145)	<i>C. hominis</i> (140) <i>C. parvum</i> (2) Mixte (3)	Eau de rivière
1995, Floride, USA	70 (6)	<i>C. hominis</i>	Contamination de l'eau du robinet dans un camp
1995, Georgie, USA	2 900 (3)	<i>C. hominis</i>	Eau de parc
1996, Kelowna, Colombie britannique, Canada	157 (2)	<i>C. hominis</i>	Eau municipale
1996, Cranbrook, Colombie Britannique, Canada	29 (7)	<i>C. parvum</i>	Eau municipale
1997, Minesota, USA	369 (5)	<i>C. parvum</i>	Fontaine de zoo
1997, North Thames, Angleterre	345 (174)	<i>C. hominis</i> (158) <i>C. parvum</i> (14) Mixte (1) <i>C. meleagridis</i> (1)	Eau de puits

1997, Angleterre	22 (15)	<i>C. hominis</i> (15)	Eau de rivière
1997-98, Angleterre	34 (9)	<i>C. hominis</i> (9)	Id.
1998, Angleterre	6 (6)	<i>C. parvum</i> (6)	Eau de réservoir
1998, Angleterre	62 (25)	<i>C. parvum</i> (25)	Eau de surface
1999, Angleterre	? (20)	<i>C. hominis</i> (20)	Piscine
1999, Angleterre	14 (14)	<i>C. hominis</i> (10) <i>C. parvum</i> (1) Mixte (3)	Piscine
1999, Angleterre	11 (10)	<i>C. parvum</i> (10)	Piscine
1999, Angleterre	16 (9)	<i>C. hominis</i> (6) <i>C. parvum</i> (3)	Piscine
1999, Angleterre	11 (3)	<i>C. hominis</i> (3)	Piscine
1999, Angleterre	347 (337)	<i>C. parvum</i> (331) <i>C. hominis</i> (4) <i>C. meleagridis</i> (2)	Eau de surface réservoir
2000, Ohio, USA	700 (31)	<i>C. hominis</i> (31) <i>C. parvum</i> (31)	Piscine
2000, Angleterre	58 (39)	<i>C. parvum</i>	Eau du robinet contaminée par fèces d'animaux
2000, Irlande du Nord	117 (32)	<i>C. hominis</i>	Réservoir contaminé par déchets humains
2000, Irlande du Nord	129 (33)	<i>C. parvum</i>	Eau de consommation
2001, Irlande du Nord	230 (44)	<i>C. hominis</i> (36) <i>C. parvum</i> (8)	Arrivée d'eau provenant d'un conduit bouché
2001, France	563 (31)	<i>C. hominis</i>	Eau contaminée par fèces humains

Tableau XVI: Espèces de *Cryptosporidium* identifiées lors d'épidémies de cryptosporidioses liées à l'eau d'après Smith, Caccio *et al.* 2006

A l'échelle mondiale, *C. hominis* semble être l'espèce la plus impliquée dans l'origine de ces épidémies (Xiao, Fayer *et al.* 2004; Smith, Caccio *et al.* 2006), relativisant le rôle joué par les animaux dans la contamination d'eau potable, *C. hominis* étant, rappelons-le, spécifique de l'être humain.

Cependant, des différences existent entre le continent européen et le reste du monde. En effet, si 75 % des épidémies ayant eu lieu aux USA ont été attribuées à *C. hominis* (Ramirez, Ward *et al.* 2004) comme c'est le cas aussi en Australie, au Kenya, au Pérou ou au Guatemala, la majorité des épidémies recensées au Royaume-Uni semble bien liée à *C. parvum*. On évoque une différence de statut sérologique entre les deux populations expliquant des protections différentes vis à vis des espèces de cryptosporidies. Mais le rôle de la contamination par le bétail semble jouer un rôle majeur au Royaume-Uni. La démonstration en a été faite lors

de l'épidémie de fièvre aphteuse en 2001 qui avait conduit à prendre des mesures drastiques d'hygiène entre bétail contaminé et humains. En effet, dans le même temps, une diminution de 81,8 % des cas humains de cryptosporidiose par rapport à l'année précédente a été constatée démontrant l'efficacité des mesures d'hygiène dans la maîtrise des épidémies de cryptosporidiose (Ramirez, Ward *et al.* 2004; Caccio, Thompson *et al.* 2005).

Aux USA, sur les 12 épidémies majeures survenues entre 1993 et 1998, la responsabilité de *C. hominis* a été mise en cause dans 8 épidémies. Parmi elles a eu lieu la plus importante des contaminations humaines liées à l'eau de toute l'histoire américaine. Il s'agit de l'épidémie du Milwaukee en 1993 ayant touché 403 000 personnes, suite à la contamination du lac Michigan. L'espèce a été identifiée chez (seulement) 5 personnes, il s'agissait de *C. hominis* (McLauchlin, Amar *et al.* 2000).

Les rares épidémies liées à *C. parvum* ont toujours montré une origine animale proche. Ainsi en 1993 dans le Maine (USA) après ingestion de cidre contaminé (160 cas), en 1996, Colombie Britannique (Canada), par contamination d'un réservoir d'eau potable situé à proximité du bétail (2 000 cas) et en 1997 en Pennsylvanie (USA) chez 3 familles ayant réalisé l'acquisition de jeunes veaux contaminés (5 cas).

En France, une épidémie a été particulièrement documentée et décrite en 2001. elle a fait l'objet d'un rapport de l'I.N.V.S. (Institut national de Veille Sanitaire). Il décrit l'apparition de cas groupés de syndromes diarrhéiques dans une petite commune de Saône-et-Loire : Dracy-le-Fort (Di Palma *et al.* 2003). 397 cas de cryptosporidiose y ont été confirmés et 86 cas ont été considérés comme probables. L'origine de cette épidémie présentant un taux d'attaque particulièrement élevé (61.8% de la population) a trouvé son origine dans une contamination massive ponctuelle du réseau de distribution d'eau potable par un refoulement d'eaux usées. L'espèce en cause n'a malheureusement pas été identifiée.

L'épidémiologie apparaît donc complexe. Elle doit être étudiée de façon segmentée puisqu'elle varie en fonction des groupes considérés. Malgré cela, nous restons peut-être dans une vision simpliste de la situation. En effet, des recombinaisons d'espèces entre *C. parvum* et *C. hominis* sont également évoquées. Les analyses des gènes des glycoprotéines de surface parasitaire (gp60) ont montré l'existence d'allèles Ic retrouvés chez les formes humaines de *C. parvum* mais absentes des formes bovines (500 isolats étudiés). On évoque la possible recombinaison de l'allèle Iia du *C. parvum* avec l'allèle Ib de *C. hominis*... L'hypothèse d'une souche humaine de *C. parvum* (GT2) plus spécifique de l'être humain que du bétail est également évoquée (Hunter et Thompson 2005). Si elle était confirmée, cette hypothèse ferait de la contamination humaine par les animaux d'élevage une cause mineure de transmission, surestimée à l'heure actuelle. Cette dernière hypothèse serait peut-être appuyée par les toutes premières analyses de polymorphisme effectuées par R.A.P.D. Cette technique avait en effet permis de différencier quatre groupes au sein des *Cryptosporidium*: les isolats d'animaux, les isolats de reptiles, les isolats humains et un isolat humain plus proche de l'isolat animal que de l'humain (Carey, Lee *et al.* 2004). Cette hypothèse est également soulevée par les analyses des microsatellites (Caccio, Thompson *et al.* 2005).

De quoi être pris d'un vertige épidémiologique !

Pour résumer :

La résistance des oocystes, leur petite taille et la faible dose infectieuse constituent des atouts indéniables à la dissémination de cette parasitose.

Les aliments et l'eau, potable ou de loisir, constituent les deux principales sources de contamination humaine dans la population générale. On y distingue les cas sporadiques, liés en majorité à *C. parvum* sur le vieux continent et à *C. hominis* sur le continent américain ; et les cas épidémiques liés indifféremment à l'une de ces deux espèces .

Les enfants et les individus immunodéprimés forment deux groupes particulièrement à risque de cryptosporidiose et des espèces telles que *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* voire *C. muris* peuvent être retrouvées dans cette population.

II- TRADUCTION CLINIQUE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE CHEZ L'HOMME

II.1- Symptomatologie

On distingue communément trois groupes bien distincts ayant fait l'objet d'études : les adultes sains, les enfants des pays en voie de développement et les immunodéprimés (Kosek, Alcantara *et al.* 2001; Huang, Chappell *et al.* 2004).

II.1.1- Les individus sains

L'infection par les cryptosporidies peut être asymptomatique (Fayer 2004). Le pourcentage de ces formes asymptomatiques (mais contagieuses) est très mal connu. On estime que 0 à 2% des adultes des pays développés peuvent être dans ce cas, contre 0 à 9,8% dans les pays en voie de développement (Centers for Disease Control and Prevention 1997).

Lorsqu'elle est symptomatique, dans plus de 80% des cas (Carey, Lee *et al.* 2004), l'infection est d'abord soumise à une période d'incubation appelée période pré-patente. Elle est d'en moyenne 7 jours (Quiroz, Bern *et al.* 2000; Kosek, Alcantara *et al.* 2001 ; Hu, Tong *et al.* 2007) mais peut aller de 2 jours (Hu, Tong *et al.* 2007) jusqu'à 3 semaines (Ramirez, Ward *et al.* 2004).

La période d'état est caractérisée par des diarrhées, des crampes abdominales, de l'anorexie, de la fièvre et des vomissements (Kosek, Alcantara *et al.* 2001; Ramirez, Ward *et al.* 2004). Sa durée est en moyenne de 9 à 12 jours (Quiroz, Bern *et al.* 2000; Kosek, Alcantara *et al.* 2001; Fayer 2004; Ramirez, Ward *et al.* 2004; Hu, Tong *et al.* 2007) mais peut être de plusieurs mois (Ramirez, Ward *et al.* 2004). (**Tableau XVII**)

Les diarrhées peuvent être aiguës ou chroniques, fébriles (35% dans les formes aiguës, 63% dans les formes chroniques), vomitives (44% en mode aigu, 31% en mode chronique), sanglantes (14% en aigu, 31% en chronique), glaireuses (21% en aigu, 19% en chronique), purulentes (28% en aigu, 38% en chronique) (Huang,

Chappell *et al.* 2004). L'excrétion d'oocystes se poursuit en moyenne jusqu'à 6,9 jours après la guérison clinique (Fayer 2004).

Symptômes	% des étudiants malades (n=88)	% des cas confirmés par le laboratoire ^a (n=14)	% des cas cliniques sans confirmation ^a (n=74)
Diarrhées ^b	100	100	100
Perte d'appétit	94	100	81
Nausées	93	93	93
Fatigue	90	100	80
Céphalées	81	93	78
Fièvre	72	71	72
Myalgies	64	57	84
Vomissements	61	64	83
Durée de la maladie (moyenne) ^c	6 jours (1 à 23)	6	6
Incubation (moyenne)	6.5 jours (0 à 21)	6.5	7

Tableau XVII: Caractères cliniques de la maladie chez l'immunocompétent à l'occasion d'une contamination alimentaire de 88 étudiants sur un campus de Washington en 1998. (D'après (Quiroz, Bern *et al.* 2000; Okhuysen and Chappell 2002; Huang, Chappell *et al.* 2004). La contamination impliquait *C. hominis*.

(a) : absence de différence significative entre les deux groupes

(b) : critère retenu par la définition d'un cas

(c) : sur 8 cas confirmés par laboratoire et 60 cas définis par la clinique

Souvent aurait lieu un épisode de récurrence après un intervalle asymptomatique (Quiroz, Bern *et al.* 2000; Centers for Disease Control and Prevention 1997).

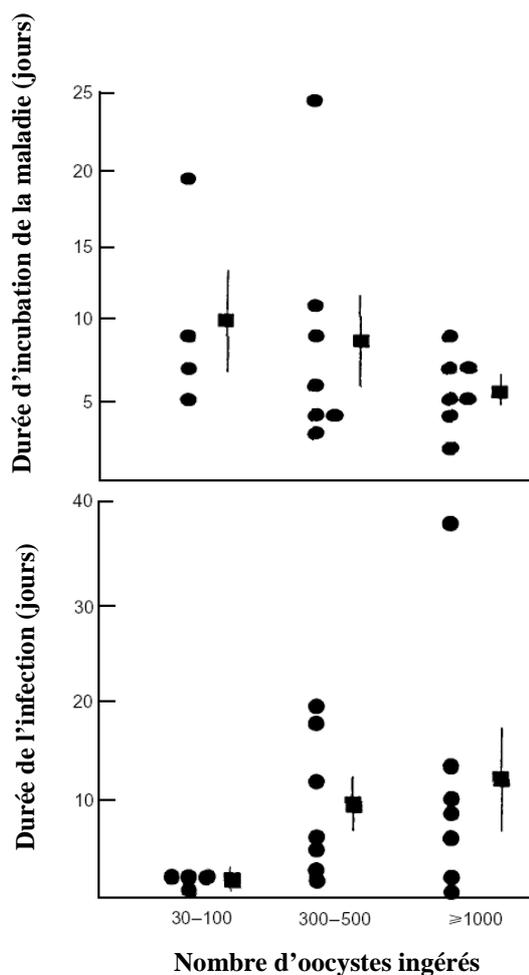
Des variations de manifestations cliniques seraient évoquées en fonction des espèces. La durée d'excrétion serait plus longue et par conséquent le nombre d'oocystes excrétés plus important pour *C. hominis* que pour *C. parvum* : 13,9 jours pour *C. hominis* versus 6,4 jours pour *C. parvum* dans une étude péruvienne chez des enfants (p=0.004) (Caccio, Thompson *et al.* 2005). En revanche, les cryptosporidioses d'origine animale seraient plus sévères (Okhuysen and Chappell 2002; Gatei, Greensill *et al.* 2003).

Les individus de « race » blanche seraient plus touchés que ceux de « race » noire (Colford, Tager *et al.* 1996; Hunter et Nichols 2002), sans explication connue.

Patient n°	Nombre d'oocystes ingérés	Incubation (jours)	Durée de la maladie (heures)	Nombre maximal de selles diarrhéiques par jour	Nombre de selles diarrhéiques pendant la maladie	Poids total de selles durant la maladie (kg)
1	100	7	58	7	7	1.24
2	100	9	87	4	9	0.71
3	100	5	65	7	11	1.39
4	500	5	86	11	31	2.06
5	500	11	75	5	12	2.14
6	10 000	4	72	7	11	0.65
7	1 000 000	22	72	4	8	0.40
Moyenne		9	74	6.4	12.7	1.23

Tableau XVIII : Evaluation de la répercussion de la dose d'oocystes ingérés sur la clinique chez 7 volontaires sains (d'après DuPont, Chappell *et al.* 1995; Smith, Nichols *et al.* 2005). Ces 7 patients correspondent à 39% des effectifs totaux expérimentalement infectés et ayant déclaré une cryptosporidiose clinique.

Figure 18: Relation entre inoculum et périodes d'incubation et d'excrétion des oocystes, regroupant les infections symptomatiques (7 patients) ou non symptomatiques (11 patients). Les différences ne sont pas significatives entre les différents groupes (DuPont, Chappell *et al.* 1995; Okhuysen et Chappell 2002; Huang, Chappell *et al.* 2004).



Par ailleurs, comme nous l'avons déjà remarqué précédemment, ni la durée d'incubation, ni la durée de la maladie ne semblent influencées par la dose d'oocystes ingérés (**Figure 18 et tableau XVIII**) (DuPont, Chappell *et al.* 1995; Colford, Tager *et al.* 1996).

II.1.2- Les enfants dans les pays en voie de développement

Les enfants constituent un groupe particulièrement à risque de cryptosporidiose. Le premier cas décrit chez l'Homme concernait un enfant de trois ans, *a priori* en l'absence de tout déficit immunitaire (Nime, Burek *et al.* 1976).

Les enfants des pays en voie de développement ont fait l'objet de nombreuses études. Les résultats obtenus ne seront pas forcément transposables aux enfants des pays développés qui ne connaissent pas les mêmes habitudes de vie.

L'infection des enfants peut être exactement identique à celle des adultes sains. Elle peut s'en démarquer également par certaines caractéristiques et une mortalité non négligeable dans les pays en voie de développement :

- ✓ Les cas asymptomatiques y paraissent très fréquents (Checkley, Gilman *et al.* 1997). Ainsi seuls 29% des 85 épisodes infectieux recensés par une étude péruvienne ont été symptomatiques avec des épisodes diarrhéiques.
- ✓ La durée d'excrétion apparaît plus longue pour 13% d'entre eux pouvant perdurer 2 à 5 mois même chez des enfants immunocompétents (Newman, Sears *et al.* 1999; Kosek, Alcantara *et al.* 2001).
- ✓ La répercussion sur la croissance de l'enfant peut être majeure avec une véritable cassure de la courbe de croissance staturo-pondérale, surtout pour les infections à long terme et ce, même en l'absence de signes cliniques, d'après une étude prospective menée sur 2 années avec des enfants âgés de

0 à 3 ans (Checkley, Gilman *et al.* 1997; Kosek, Alcantara *et al.* 2001; Ramirez, Ward *et al.* 2004).

- ✓ Les formes peuvent être particulièrement intenses avec possibilité d'observer jusqu'à 20 selles par jour avec en moyenne 5,1 selles par jour en évolution aiguë et 9 par jour en évolution chronique (Huang, Chappell *et al.* 2004).
- ✓ Les symptômes pulmonaires apparaissent fréquents (jusqu'à 15% des enfants), se manifestant par des bronchites, des dyspnées ou des douleurs thoraciques.

II.1.3- Les immunodéprimés

Ils sont particulièrement concernés puisque leur pronostic vital peut être mis en jeu par cette infection (O'Donoghue 1995).

II.1.3.a- Formes d'immunodépression concernées

L'immaturation du système immunitaire chez les jeunes enfants ne sera pas considérée ici.

Certaines formes de déficit immunitaire congénital peuvent favoriser l'expression de la maladie. Il s'agit essentiellement des hypogammaglobulinémies, du syndrome d'hyper IgM lié au chromosome X s'accompagnant d'un déficit en protéine CD40L, le déficit en IgA et le SCID (ou syndrome d'immunodépression combinée sévère) (Xiao, Fayer *et al.* 2004). Ce dernier a été responsable d'une forme fatale à localisation intestinale et pulmonaire (Kocoshis, Cibull *et al.* 1984; Hunter et Nichols 2002).

Les greffés de moelle ou les transplantés d'organe ainsi que les enfants dénutris et surtout les patients porteurs du virus du S.I.D.A. présentent un déficit immunitaire acquis favorisant très largement la cryptosporidiose. Quant à l'état de

dénutrition, c'est un sujet controversé, car faire le rapport de cause à effet entre dénutrition et infection diarrhéique suppose de ne pas confondre cause et effet, ce qui n'est évidemment pas tâche aisée !

De façon générale, la sévérité de l'atteinte digestive semble inversement corrélée avec le taux de lymphocytes T CD4.

II .1.3.b- Particularités cliniques chez les immunodéprimés

Les principales différences dans l'évolution de la maladie entre individus immunocompétents et immunodéprimés sont rassemblées dans le **tableau XIX**.

Le risque principal que l'on trouve dans cette population est le risque de décès par déshydratation et complications métaboliques de diarrhées aiguës et/ou chroniques de forme sévère.

La prévalence globale de la cryptosporidiose chez ces patients a été estimée à 6,6% en Europe et 3,8% à Los Angeles (Hunter et Nichols 2002) et le taux d'attaque de cette population est particulièrement élevé par rapport à une population saine (Hashmey, Smith *et al.* 1997). L'explication repose vraisemblablement sur la diminution de la dose nécessaire au déclenchement de la maladie.

Globalement, les parasites sont souvent mis en évidence chez les sujets V.I.H. présentant une diarrhée. Une étude longitudinale menée sur 3 ans de 1991 à 1994 avec 602 patients a mis en évidence qu'une étiologie parasitaire était en cause dans 14,1% des diarrhées aiguës (5,1% liées à *C. parvum*) et 34,8% des diarrhées chroniques (12,9% liées à *C. parvum*). La part des infections diarrhéiques liée à des affections parasitaires augmente avec le degré d'immunodépression, passant de 14% pour un taux de lymphocytes T CD4 supérieur ou égal à 200 / μ L, à 26,5% pour un taux inférieur à 200 / μ L (Navin, Weber *et al.* 1999).

Caractéristiques	Immunodéprimés	Immunocompétents
Population la plus exposée	Tous âges, HIV particulièrement concernés	Enfants, surtout âgés de moins de un an et adultes de tous âges
Site de l'infection	Intestinal ou extra-intestinal	Intestinal
Présentation digestive	Asymptomatique, aiguë, chronique ou fulminante	Asymptomatique, aiguë ou chronique
Signes cliniques classiques	Diarrhées, fièvre, douleurs thoraciques, ictère, perte de poids, vomissements	Diarrhées, fièvre, crampes abdominales, vomissements, nausées et perte de poids
Durée de la maladie	De 2 jours à toute la vie	Jusqu'à 2 semaines en général
Sévérité en fonction des LT CD4 >200/ μ L <100/ μ L <50/ μ L	Résolution spontanée Chronique ou extra-intestinale Fulminante	
Evolution possible	Transitoire ou asymptomatique (5 à 184 semaines) Chronique (3-127 semaines) Fulminante (2-28 semaines jusqu'au décès)	Importante mortalité chez les nourrissons et jeunes enfants dans les pays en voie de développement
Traitement	HAART +/- antiparasitaires	Pas de traitement spécifique

Tableau XIX : Caractéristiques de la cryptosporidiose en fonction du terrain immunitaire de l'hôte (d'après Carey, Lee *et al.* 2004 ; Smith, Nichols *et al.* 2005)

On considère qu'un taux de CD4 inférieur à 200 par μ L fait passer le patient dans un groupe particulièrement à risque de cryptosporidiose avec 87% de formes plus sévères que chez l'immunocompétent (Colford, Tager *et al.* 1996; Vakil, Schwartz *et al.* 1996; Kosek, Alcantara *et al.* 2001), et que le seuil de 100 CD4 par μ L fait passer le patient dans la population à risque très important (Morgan, Weber *et al.* 2000).

Cette parasitose a été jugée responsable d'environ 1% de l'ensemble des décès de patients sidéens aux USA entre 1987 et 1992 (Selik, Chu *et al.* 1995), bien après les pneumonies, les mycobactérioses atypiques et la pneumocystose (**Annexe 6**). Depuis, l'efficacité des nouveaux traitements anti-rétroviraux a bien sûr bouleversé ces données.

Le tableau clinique peut prendre divers aspects, il peut être totalement semblable à celui des adultes sains ou prendre un caractère plus sévère allant jusqu'aux expressions cholériformes (Colford, Tager *et al.* 1996). Ces formes dites « fulminantes » s'accompagnent d'une excrétion de plus de 2 litres (jusqu'à 20L) de selles par jour (Hernandez, Lackner *et al.* 2007) et sont décrites chez les

individus possédant moins de 50 lymphocytes T CD4 par μL (Hunter et Nichols 2002; Carey, Lee *et al.* 2004).

Le tableau clinique peut aussi prendre un caractère chronique évoluant sur plusieurs mois. Ces formes entraînent également des déshydratations majeures responsables d'hospitalisations et parfois du décès du patient. Des formes disséminées biliaires et pulmonaires sont observées pour des taux de CD4 inférieurs à 50 μL (Faraci, Cappelli *et al.* 2007). Ces formes sont particulièrement de mauvais pronostic (Vakil, Schwartz *et al.* 1996; Morgan, Weber *et al.* 2000).

Des présentations atypiques de cryptosporidiose du V.I.H. ont été recensées (Hunter et Nichols 2002):

➤ Atteintes gastro-intestinales :

- des atteintes gastriques sans expression clinique obligatoire
- des *pneumosis cystoides intestinalis*, qui correspondent à des localisations erratiques d'oocystes à paroi mince remplis de gaz qui, lorsqu'ils se rompent, entraînent des pneumorétropéritonies ou pneumomédiastins.
- des atteintes oesophagiennes avec nausées et vomissements
- des appendicites

➤ Atteintes des voies biliaires :

- des cholangites sclérosantes avec lien prédictif sur la mortalité plutôt que lien causal direct

➤ Atteintes pancréatiques :

- en général limitées à une légère métaplasie
- de rares cas de pancréatites aiguës ou chroniques sans augmentation de la mortalité

- Atteintes hépatiques :
 - des hépatites...mais sans preuves formelles (O'Donoghue 1995)

- Atteintes des voies respiratoires (O'Donoghue 1995; Mercado, Buck *et al.* 2007) :
 - toux
 - wheezing

II.2- Physiopathologie et rôle du système immunitaire

La physiopathologie des cryptosporidioses est encore mal connue à l'heure actuelle mais on sait qu'elle est grandement dépendante du statut immunitaire de l'hôte (Carey, Lee *et al.* 2004).

On peut distinguer la pathogénicité directe de la pathogénicité indirecte :

La pathogénicité directe correspond à l'atteinte de l'intégrité des cellules épithéliales au niveau du jéjunum et de la partie terminale de l'iléon chez l'immunocompétent et dans d'autres localisations erratiques chez l'immunodéprimé. Cette atteinte directe se traduit *in vitro* par l'augmentation des taux de lactate déshydrogénase dans le surnageant de culture (Carey, Lee *et al.* 2004) et *in vivo* par une atrophie villositaire et une augmentation du nombre de cryptes.

La pathogénicité indirecte est liée à la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

Ces deux paramètres aboutissent à un phénomène de malabsorption du glucose et du sodium, une sécrétion accrue de chlore dans la lumière intestinale, une inflammation et une disjonction de la barrière cellulaire.

De nombreuses études sont actuellement menées sur l'étude des facteurs de virulence et la dysrégulation immunitaire liée à l'infection.

II.2.1- Facteurs de virulence des *Cryptosporidium*

Il semble exister entre les différentes espèces et souches de *Cryptosporidium* des différences de pathogénicité encore mal expliquées à l'heure actuelle (**Tableau XX**).

Au sein de l'espèce *C. hominis*, il semblerait exister un sous-type (allèle 1b) qui serait plus particulièrement virulent et/ou infectieux pour l'Homme (Smith, Caccio *et al.* 2006).

Isolat	Espèce	Source animale	DI ₅₀	Taux d'attaque en %	Durée de la diarrhée en heures +/-ET
UCP	<i>C. parvum</i>	Bovine	1 042	59	81.6 +/- 59.68 (6-193)
Iowa	<i>C. parvum</i>	Bovine	87	52	64.2 +/- 67.43 (6-223)
TAMU	<i>C. parvum</i>	Equine	9	86	94.5 +/- 66.7 (6-195)

Tableau XX : Données concernant des volontaires exposés à 3 souches distinctes de *C. parvum* (d'après Okhuysen et Chappell 2002; Smith, Nichols *et al.* 2005) p<0.05 pour TAMU vs UCP ou Iowa.

De nombreuses protéines de surface (Okhuysen et Chappell 2002) semblent vouloir jouer un rôle dans la virulence de ce parasite (**Annexe 7**).

II.2.1.a- Facteurs d'adhésion

Ils permettent l'attachement des sporozoïtes aux cellules cibles. On distingue parmi les protéines les plus citées : les lectines, le CSL (Circumsporozoïte-like) favorisant la pénétration de la cellule intestinale par ligation de la protéine S cellulaire, la gp 900, le complexe gp 15/40/60, TRAP-C1 qui interviendrait de façon importante dans la spécificité d'hôte (Peng, Xiao *et al.* 1997), Cp 47, CPS500, Gal/GalNAc lectine, p23 (Carey, Lee *et al.* 2004).

La présence d'une entérotoxine pourrait expliquer le phénomène d'atrophie villositaire et une sécrétion accrue de prostaglandines E₂, F_{2α} et de PGH synthase 2 par les cellules épithéliales (Laurent, Kagnoff *et al.* 1998).

II.2.1.c- Enzymes parasitaires

La présence de phospholipases, de protéases et d'hémolysines est citée pour expliquer la destruction des « Tight Junctions » inter-cellulaires observée *in vitro* sur cultures monocouches.

Le gène de l'hémolysine H4 présenterait des similarités avec celui de l'hémolysine plasmidique d'*Escherichia coli* O157:H7.

II.2.1.d- Apoptose

L'apoptose des cellules contiguës à la cellule infectée est déclenchée par l'infection après engagement dans la voie de signalisation des caspases. Il s'agit vraisemblablement d'un mode de protection de l'organisme visant à contrer l'extension de l'infection parasitaire (Deng, Rutherford *et al.* 2004). En revanche, la cellule infectée semble quant à elle protégée du phénomène apoptotique par l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) (Chen, Levine *et al.* 2001).

II.2.2- Conséquences cellulaires

Histologiquement, l'infection par des cryptosporidies entraîne une atrophie villositaire, une hyperplasie des cryptes (Carey, Lee *et al.* 2004) ainsi qu'une inflammation de la *Lamina propria*.

D'un point de vue biochimique, on observe une augmentation de la synthèse des ARN messagers de la substance P et de son récepteur NK1 ainsi qu'une surproduction des protéines correspondantes. La substance P est le neuropeptide médiateur de la douleur mais il pourrait jouer un rôle majeur dans l'expression clinique des cryptosporidioses : il est connu pour augmenter la sécrétion de chlore extra-cellulaire. L'administration d'anti-substance P a entraîné l'arrêt de la symptomatologie chez 4 macaques artificiellement infectés (Hernandez, Lackner *et al.* 2007).

Par ailleurs, la production de prostaglandines E_2 , $F_{2\alpha}$ et de PGH synthase 2 par les cellules entériques est augmentée (Laurent, Kagnoff *et al.* 1998; Carey, Lee *et*

al. 2004) et pourrait expliquer l'hypersécrétion aqueuse et l'hypersécrétion de mucus.

D'un point de vue immunologique, on constate une augmentation de la production cytokinique et en particulier de l'IL-8 et du TNF- α (Newman, Sears *et al.* 1999; Xiao, Lal *et al.* 1999). L'inflammation localisée se traduit par un afflux de polynucléaires, de macrophages et de lymphocytes au sein de la *Lamina propria* (Deng, Rutherford *et al.* 2004).

Une action immunosuppressive propre à la maladie est envisagée puisqu'on constate une augmentation de la mortalité des patients indépendamment du statut social, nutritionnel ou des conditions d'hygiène (Molbak, Hojlyng *et al.* 1993; Xiao, Lal *et al.* 1999; Kosek, Alcantara *et al.* 2001) par rapport à une population témoin.

II.2.3- Physiopathologie et immunologie propre au patient V.I.H.

L'action immunosuppressive préalablement évoquée chez les individus immunocompétents est également retrouvée chez les patients V.I.H. On constate une augmentation de la mortalité indépendante du taux de lymphocytes T CD4 et un risque accru de décès face à des maladies identiques (Colford, Tager *et al.* 1996; Manabe, Clark *et al.* 1998) par rapport à des individus non infectés par des cryptosporidies mais ayant d'autres infections opportunistes (Xiao, Lal *et al.* 1999).

La réplication du V.I.H. est augmentée lors d'une cryptosporidiose. De récents articles évoquent le rôle de CXCL10 appelée également IP-10 (Inductible Protein 10) appartenant au groupe des chemokines de type CXC. L'augmentation de sa production n'est pas compensée par les lymphocytes porteurs de son récepteur CXCR3. Or, CXCL-10 augmente *in vitro* la réplication du V.I.H. Une cryptosporidiose survenant sur un terrain immunodéprimé pourrait donc accélérer l'évolution de la maladie V.I.H.

Le taux de TNF- α augmenté lors d'une cryptosporidiose pourrait également augmenter la réplication du V.I.H. En effet, la production d'antigène p24 est accrue par des taux élevés de TNF- α lors des essais d'infections *in vitro*.

Enfin, la découverte du stade S.I.D.A. par l'apparition d'une cryptosporidiose est de plus mauvais pronostic que toute autre infection opportuniste faisant entrer le patient dans ce stade de la maladie. Il s'agirait alors d'un facteur pronostic négatif de survie (Colford, Tager *et al.* 1996, Vakil, Schwartz *et al.* 1996, Xiao, Lal *et al.* 1999).

II.2.4- Immunité anti-cryptosporidiose

II.2.4.a- Rôles de l'immunité à médiation humorale et cellulaire

L'immunité anti-*Cryptosporidium* est encore mal connue à l'heure actuelle. Elle semble efficace à court terme puisqu'on constate une augmentation des DI₅₀ de 50% (Kosek, Alcantara *et al.* 2001) mais incomplète et peu protectrice puisqu'elle ne permet pas d'éviter les infections successives avec des espèces différentes ou non (Xiao, Bern *et al.* 2001; Xiao, Fayer *et al.* 2004).

On suppose une action combinée des différents types d'immunité avec un rôle majeur de l'immunité à médiation cellulaire. En effet, les infections chez la souris déplétée en lymphocytes B semblent identiques à celles observées chez les souris non déplétées (O'Donoghue 1995; Hunter et Nichols 2002) attribuant de fait un rôle mineur à l'immunité à médiation humorale dans le contrôle de la maladie. L'étude des marqueurs sérologiques d'infection montre l'existence d'une réponse humorale avec apparition d'anticorps d'isotype G, M, A et E dans les 5 à 8 jours suivant l'infection, le pic maximal étant obtenu en 8 à 15 jours et coïncidant avec la résolution de l'infection (Riggs 2002). Des IgA sécrétoires fécales sont aussi présentes mais leur rôle protecteur est discuté (Riggs 2002).

Les structures antigéniques concernées semblent extrêmement conservées entre les différentes phases du cycle de multiplication : CSL, gp900, CP47, TRAP-C1, P23, gp25-200, CPS-500.

Les IgG semblent pouvoir persister plusieurs mois. Le rôle de cette réponse humorale ne doit cependant pas être totalement dévaluée puisque les hypogammaglobulinémies et agammaglobulinémies sont un facteur de risque de cryptosporidioses (Kosek, Alcantara *et al.* 2001) chroniques et sévères. L'allaitement maternel chez l'Homme et le veau semble jouer un rôle protecteur (O'Donoghue 1995). L'étude du colostrum hyperimmun de bovin montre une teneur très élevée en immunoglobulines spécifiques d'isotypes G1, G2, M et A. Il est efficace en prophylaxie de l'infection du veau avec diminution des symptômes cliniques et réduction du nombre d'oocystes excrétés (Riggs 2002). Le rôle concomitant et synergique des cytokines contenues dans le lait n'est vraisemblablement pas à négliger. Des essais ont été menés chez l'Homme par immunisation passive mais sans résultat fiable (Riggs 2002).

L'immunité à médiation cellulaire semble être la pierre angulaire de la réponse immunitaire comme le montre la preuve par l'absence de ce type d'immunité. L'exemple type en est la souris SCID ou nude dont la guérison est obtenue par greffe de thymocytes, de cellules spléniques, de moelle osseuse ou de lymphocytes mésentériques. C'est le cas aussi des patients sous immunosuppresseurs qui voient leur maladie s'améliorer à l'arrêt (ou la diminution) de leur traitement mais surtout des patients V.I.H. présentant de faibles taux de lymphocytes T CD4 et dont l'immunité est restaurée par un traitement anti-rétroviral.

Les lymphocytes T CD8 ne semblent pas jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'infection, mis à part la catégorie particulière des LT CD8 IEL (Riggs 2002).

L'interféron- γ , et l'interleukine 12 qui en provoque la synthèse et la sécrétion, semblent jouer un rôle majeur dans la protection de l'organisme. Les modèles murins déficitaires en IFN- γ par inactivation du gène correspondant (Kosek, Alcantara *et al.* 2001), subissent une infection généralisée et meurent en 2 à 3 semaines (Newman, Sears *et al.* 1999; Kosek, Alcantara *et al.* 2001; Hunter et Nichols 2002). Quant aux rats adultes immunodéprimés par corticoïdes, ils voient leur infection largement réduite par l'administration d'IFN- γ (Riggs 2002).

Le TNF- α pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la réplication parasitaire (Deng, Rutherford *et al.* 2004).

Enfin, un rôle est attribué aux mastocytes dans la résistance naturelle à l'infection, chez la souris (Hunter et Nichols 2002), de même qu'aux β -défensines dont l'expression est augmentée suite à l'infection chez le veau (Deng, Rutherford *et al.* 2004).

Le rôle éventuel des cellules NK dans le contrôle de l'infection n'est pas établi.

II.2.4.b- Cas particulier des patients V.I.H.

Chez le patient contaminé par le virus du S.I.D.A., on peut évoquer deux modes d'acquisition possible de l'infection : ou il s'agit d'une infection suite à l'ingestion récente d'oocystes, ou bien il s'agit d'une infection latente démasquée par la progression de l'immunodépression (Morgan, Weber *et al.* 2000). L'infection chez ces patients ne se limite pas au jéjunum et à l'iléon terminal mais peut s'étendre à de nombreux épithéliums.

Le patient V.I.H. déficitaire en lymphocytes T CD4 et présentant donc une immunité à médiation cellulaire altérée est une cible privilégiée d'acquisition et d'expression de la maladie. L'*odd ratio* de la prévalence des cryptosporidioses calculé sur une population V.I.H. de 194 patients est établi à 12,60 entre le groupe de patients possédant l'équivalent ou moins de 53 CD4 / μ L et celui en possédant un taux supérieur (Morgan, Weber *et al.* 2000).

Les diarrhées d'origine parasitaire sont observées de façon plus fréquente chez le patient V.I.H. à faible taux de lymphocytes T CD4 surtout pour un taux inférieur à 200 / μ L (Xiao, Fayer *et al.* 2004) et les *Cryptosporidium* y sont sur-représentés au sein d'entités cliniques plus sévères (Navin, Weber *et al.* 1999).

Ces éléments confirment bien le rôle majeur de l'immunité à médiation cellulaire dans le contrôle de l'infection.

Pour résumer :

- ✓ **Chez l'adulte immunocompétent, l'infection peut rester asymptomatique ou se traduire par un syndrome diarrhéique accompagné de fièvre et de vomissements pendant une durée d'environ 10 jours. La dose d'oocystes ne semble pas modifier la sévérité de la maladie.**

- ✓ **Chez les enfants des pays en voie de développement, les infections sont souvent asymptomatiques. La survenue d'un état de dénutrition et la cassure de la courbe de croissance en est la manifestation la plus fréquente. Le décès par déshydratation peut cependant survenir.**

- ✓ **La maladie peut être fatale chez l'immunodéprimé et notamment le patient V.I.H. possédant moins de 200 lymphocytes T CD4 par μ L. Des formes fulminantes surviennent chez les individus présentant moins de 50 lymphocytes T CD4 par μ L. Les formes chroniques et invalidantes ne sont pas rares.**

Les facteurs de virulence des cryptosporidies sont mal connus à l'heure actuelle mais il semble exister des souches de virulence différente.

Les lymphocytes T CD4 et l'IFN- γ jouent un rôle majeur dans la maîtrise de l'infection.

III- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES CAS HUMAINS DE CRYPTOSPORIDIOSE

La recherche de cryptosporidies au laboratoire de parasitologie de Nantes est effectuée de façon systématique chez les patients V.I.H. et chez les patients immunocompétents en fonction des renseignements cliniques et/ou épidémiologiques. L'aspect de la selle peut également conduire à réaliser un diagnostic biologique. Toutefois, leur recherche ne fait théoriquement pas partie de l'examen de routine classique des selles diarrhéiques.

Sur le compte rendu du résultat d'analyse des selles, le laboratoire se devrait de préciser les recherches exactes effectuées afin d'éviter toute interprétation abusive et erronée. L'aspect des selles est à notifier et il est indispensable de prévenir les autorités sanitaires lors du diagnostic de cas groupés afin de rechercher une éventuelle épidémie.

En raison de l'excrétion intermittente d'oocystes, notamment vers la fin de l'évolution de la maladie, des examens répétés doivent être prescrits afin de pallier aux éventuelles périodes de non excrétion.

En excluant les techniques de biologie moléculaire qui feront l'objet de la dernière partie de ce mémoire, on distingue trois méthodes utilisées dans le diagnostic de cryptosporidiose.

III.1- Observation microscopique de biopsies

C'est la première méthode qui a été utilisée. Elle repose sur l'observation de corps basophiles au niveau épithélial et après coloration par haematoxyline et éosine ou par coloration de Giemsa (O'Donoghue 1995). Cette observation est peu sensible car les parasites sont répartis de façon hétérogène au sein des tissus, et elle nécessite confirmation par microscopie électronique à transmission.

C'est une technique trop lourde qui n'est plus utilisée de nos jours.

III.2- Mise en évidence des oocystes

Les selles doivent idéalement être analysées le plus tôt possible mais la grande résistance des oocystes, aux conditions habituelles de température, permet de les conserver telles quelles entre 2 et 6 degrés, dans une solution formolée à 5 ou 10%, dans du MIF ou du SAF. La congélation est à proscrire (Centers for disease Control and Prevention 1997).

On distingue des techniques directes: la technique de base du lame-lamelle qui est très peu sensible ; et surtout les techniques de coloration telles que le Ziehl-Neelsen modifié (**Figure 19, Annexe 8 , Annexe 9**) (Centers for disease Control and Prevention 1997).

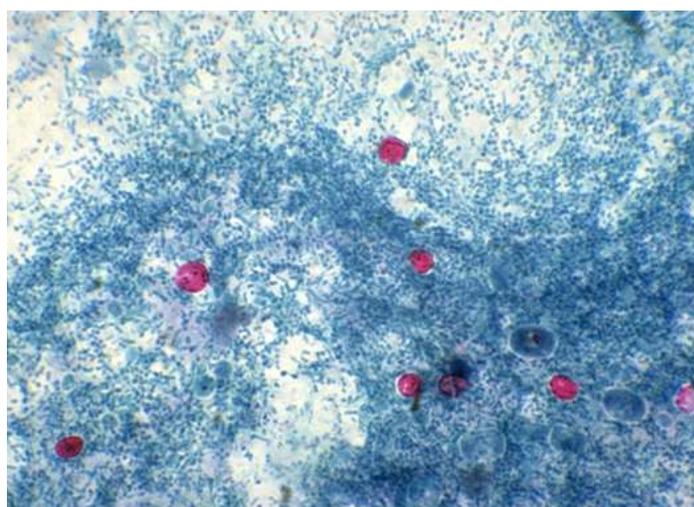


Figure 19: Observation d'une selle contenant des cryptosporidies après coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (microscope X20) (A.N.O.F.E.L.)

Ces méthodes de coloration sont globalement peu sensibles et leur interprétation demeure en grande partie subjective, surtout dans les prélèvements pauvres en formes suspectes ; on retiendra que la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée n'est pas complètement spécifique des cryptosporidies mais colore également les *Cylospora sp.*

Des méthodes de concentration peuvent être utilisées afin d'augmenter la sensibilité de la technique. Il s'agit essentiellement de techniques de séparation physique telles que la sédimentation, en gradient de densité ou par floculation (O'Donoghue 1995), et la flottation (O'Donoghue 1995; O'Brien et Jenkins 2007). Ce sont des techniques longues et coûteuses en temps qui sont peu utilisées aujourd'hui. Le Center for Disease Control and Prevention (CDC) recommande l'observation sans méthode de concentration ou la méthode à l'acétate d'éthylformol suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 500 tours/minutes (Centers for disease Control and Prevention 1997).

Sont également utilisées des techniques indirectes d'immunofluorescence, d'immuno-enzymologie E.L.I.S.A. (**Tableau XXI**), d'agglutination par particules de latex sensibilisées par des anticorps polyvalents ou monoclonaux, d'immunochromatographie voire des méthodes de cytométrie de flux.

Avantages	Inconvénients
Méthode E.L.I.S.A.	
Interprétation visuelle possible Facile Bonne méthode de screening Adaptable à de grandes séries Automatisable Sensibilité accrue	Non recommandée en remplacement de l'observation microscopique Dilution éventuelle Etape de lavage cruciale pour éviter les faux positifs Eventuelles difficultés de lecture Coût élevé
Méthode I.F.A.	
Temps d'examination court Possibilité de concentrer les selles pour une meilleure sensibilité Possibilité de détecter en même temps <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i> pour certains réactifs Séries possibles Fluorescence visible à faible grossissement	L'étape de concentration recommandée est longue Nécessité d'un microscope à fluorescence Coût élevé

Tableau XXI : Avantages et inconvénients des kits ELISA et de fluorescence en comparaison des méthodes d'observation classiques (d'après Centers for Disease Control and Prevention 1997)

Les méthodes immunochromatographiques sont en forte progression dans le domaine du diagnostic biologique des cryptosporidioses. Ce sont des méthodes sensibles, rapides et de lecture objective. Elles sont essentiellement axées sur la détection de l'espèce *C. parvum* et *C. hominis* mais des détections croisées existent.

Encadré 9:

Etant donné la faible teneur en oocystes, l'analyse de l'eau de consommation est effectuée par méthode de filtration et/ou de concentration par capture des oocystes via des microbilles magnétisables et sensibilisées par des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface des *Cryptosporidium*.

III.3- La sérologie

La sérologie a d'abord été réalisée par immunofluorescence indirecte sur coupe de biopsie fixée sur lame ; ont suivi les techniques basées sur des oocystes entiers puis sur les antigènes solubles.

Ces techniques sont difficiles à interpréter puisqu'un résultat positif témoigne d'un contact avec les cryptosporidies mais pas forcément d'une infection en cours, les anticorps pouvant persister jusqu'à 12 mois après l'infection.

Par ailleurs, les sérologies effectuées chez des individus immunodéprimés ne sont pas très informatives.

Aucune des techniques actuellement commercialisée ne permet un diagnostic d'espèce et donc un suivi épidémiologique des cryptosporidioses.

Pour résumer :

Le diagnostic biologique de l'infection repose essentiellement sur la recherche d'oocystes dans les selles par des techniques de coloration telles que le Ziehl-Neelsen modifié ou par des méthodes immunologiques. La coloration de Ziehl-Neelsen modifiée demeure l'examen de référence en France, malgré sa faible sensibilité et la subjectivité de la lecture. Les méthodes immunochromatographiques, sensibles et objectives, sont vraisemblablement destinées à occuper le devant de la scène biologique.

Ces méthodes ne permettent toutefois pas un diagnostic d'espèce et un suivi épidémiologique.

IV- TRAITEMENT DE L'INFECTION

Les traitements sont en grande partie inefficaces et ne permettent pas l'éradication des parasites (Kosek, Alcantara *et al.* 2001).

IV.1-Chez l'immunocompétent

Le traitement est uniquement symptomatique et repose essentiellement sur la réhydratation par voie orale ou, en cas d'impossibilité, par voie parentérale. Sont également utilisés les régulateurs de la motilité intestinale (lopéramide) et une supplémentation nutritionnelle, surtout chez les enfants.

IV.2-Chez l'immunodéprimé

IV.2.1- Traitement spécifique

Des traitements spécifiques sont utilisés mais leur efficacité demeure modérée.

La paromomycine (Humatin[®]) permet une réduction de la durée de la phase patente chez la souris et le veau et peut être utilisée en bithérapie avec un macrolide : l'azithromycine. L'association paromomycine et anti-motilité semble efficace (Hashmey, Smith *et al.* 1997) chez 77% des patients V.I.H. mais avec un risque important de rechute à l'arrêt du traitement. Le résultat est toutefois aléatoire (Fayer 2004). La dose usuelle est de 500 mg quatre fois par jour pendant 4 à 8 semaines puis 500 mg deux fois par jour (Carey, Lee *et al.* 2004). C'est un médicament disponible en ATU nominative (Revue du Praticien 2007).

Le nitazoxanide est commercialisé depuis 2002 sous le nom d'Alinia[®] aux USA et disponible en ATU nominative en France depuis 2005 (Revue du praticien 2007). C'est un benzamide nitrothiazolé (Fayer 2004) inhibiteur de la pyruvate ferredoxine oxydoréductase (Revue du praticien 2007), enzyme impliquée dans les réactions de transfert d'électrons du métabolisme énergétique anaérobie. C'est le seul traitement approuvé par la FDA dans le traitement des diarrhées à *Cryptosporidium* et *Giardia* chez l'enfant (Carey, Lee *et al.* 2004) et l'adulte

immunocompétents (Revue du praticien 2007). Il diminue la durée d'excrétion parasitaire mais demeure très peu efficace chez le patient V.I.H. (Revue du praticien 2007) confirmant le rôle indispensable du système immunitaire dans le contrôle de la maladie. Il peut être utilisé en association avec la rifabutine ou l'azithromycine. Sa durée de traitement est théoriquement de 3 jours. Des essais sur 14 jours à des doses de 500 à 1 000 mg deux fois par jour ont montré un arrêt de l'excrétion des oocystes chez 63 à 67% des patients V.I.H. (Carey, Lee *et al.* 2004).

La co-administration paromomycine et nitazoxanide n'a pas montré de synergie *in vitro* (Carey, Lee *et al.* 2004).

D'autres pistes de traitement sont également évoquées, sans confirmation à ce jour : le colostrum hyper immun bovin (Ramirez, Ward *et al.* 2004) qui donne des résultats mitigés (Fayer 2004) dans la prévention de la cryptosporidiose chez le veau et l'humain. Son administration en traitement curatif chez le patient V.I.H. diminue les symptômes sans éliminer le parasite (Revue du praticien 2007) Certains probiotiques (Ramirez, Ward *et al.* 2004) semblent diminuer la viabilité des oocystes. La β -cyclodextrine possède une activité *in vivo* dans les modèles animaux (Huang, Chappell *et al.* 2004).

Les anticorps monoclonaux notamment 3E2 anti-CSL paraissent avoir une bonne activité utilisés seuls ou en combinaison mais sans supprimer la persistance (Carey, Lee *et al.* 2004). Mais étant donné le laps de temps très court durant lequel les formes parasitaires sont libérées dans la lumière digestive, il apparaît peu probable que les anticorps soient un bon traitement curatif de l'infection (Carey, Lee *et al.* 2004).

L'ensemble des molécules ayant présenté une efficacité est présenté en **annexe 10**.

Suite aux études récentes, de nouvelles pistes semblent apparaître: les inhibiteurs de la substance P, les bloqueurs de protéines sur-exprimées lors de l'excystation (Smith, Nichols *et al.* 2005; Feltus, Giddings *et al.* 2006) et les IgA dimériques d'administration parentérale et d'excrétion biliaire (Riggs 2002).

Des questions demeurent : le traitement ne doit-il pas être adapté à l'espèce de *Cryptosporidium* considérée (Gatei, Greensill *et al.* 2003)? Les voies biliaires ne jouent-elles pas, chez l'immunodéprimé, le rôle de réservoir de parasites difficilement atteignable par le traitement (Riggs 2002) ?

IV.2.2- Diminution de l'immunodépression

Chez le patient V.I.H., il s'agit surtout de restaurer l'immunité cellulaire par un traitement anti-rétroviral de type H.A.A.R.T. (Highly Active Antiretroviral Therapy) incluant un inhibiteur de protéase. Ceci dit, le portage n'est pas supprimé et on observe des rechutes en cas d'interruption du traitement. Le traitement est par ailleurs peu accessible dans les pays en voie de développement (Maigné, Martinez *et al.* 2007).

Chez les patients greffés ou transplantés, on essaiera d'ajuster au mieux le traitement immunosuppresseur afin d'éviter les infections opportunistes tout en évitant le rejet du greffon.

En l'absence de remède efficace, le meilleur traitement reste donc la prévention.

Pour résumer :

Peu de molécules sont efficaces : il s'agit essentiellement du nitazoxanide. Cette molécule est indiquée chez l'enfant et l'adulte immunocompétent mais ne possède pas d'indication dans le traitement de la cryptosporidiose chez l'immunodéprimé pour lequel la restauration de l'immunité doit rester l'objectif indispensable à la guérison.

De nouvelles pistes de recherche sont évoquées aujourd'hui : inhibiteurs de substance P ou IgA dimériques.

V- PREVENTION

L'importance sanitaire et économique de la prévention est indiscutable en l'absence de traitement efficace et compte tenu du coût économique des épidémies liés aux cryptosporidies.

L'exemple de l'épidémie majeure de 1993 au Milwaukee qui a touché 403 000 personnes est révélateur puisqu'elle a généré un coût supérieur à 96,2 millions de dollar pour l'état américain (Xiao, Fayer *et al.* 2004). Celui-ci s'est réparti entre frais médicaux (31,7 millions de dollars) et perte de productivité, estimée à 65,6 millions de dollars. Les coûts par individus ont été estimés à 116 \$, 475 \$ et 7 808 \$ en fonction de l'aspect respectivement léger, modéré ou sévère de la maladie.

La prévention individuelle concerne essentiellement les individus immunodéprimés plus exposés à la maladie mais la prévention collective est indispensable afin d'éviter les épidémies majeures génératrices de morbi-mortalité et de coûts importants pour la société.

V.1- Prévention individuelle : conseils aux immunodéprimés

Les mesures de prévention individuelle s'adressent essentiellement aux personnes dont le taux de CD4 est inférieur à 200/ μ L (Hunter et Nichols 2002). Cependant, chez les patients V.I.H., on peut se demander si la prévention ne devrait pas débuter dès la notion de séropositivité car on n'exclut pas à l'heure actuelle la possibilité d'acquérir une infection alors que les CD4 sont supérieurs au taux critique, infection qui ne se révélerait qu'une fois l'immunodépression avancée (Hunter et Nichols 2002).

Afin de réduire les risques d'infection par des cryptosporidies dont on a vu le rôle très invalidant et éventuellement fatal, quelques conseils sont à prodiguer :

- ✓ Eviter le contact d'animaux diarrhéiques, les jeunes animaux de moins de 6 mois (chats, chiens, animaux de ferme), éviter le contact

direct ou indirect avec leurs selles et contrôler les selles des animaux de compagnie (Centers for Disease Control and Prevention 1997; Ramirez, Ward *et al.* 2004).

- ✓ Faire bouillir l'eau de consommation pendant une minute (bien qu'une durée moindre semblerait suffire) ou utiliser des filtres par osmose inverse dotés de pores de diamètre inférieur ou égal à 1µm (Ramirez, Ward *et al.* 2004).
- ✓ Eviter les piscines et jacuzzi car les systèmes de filtration semblent en partie inefficaces contre les *Cryptosporidium*. Eviter aussi rivières, lacs et étangs (1998; McLauchlin, Amar *et al.* 2000).
- ✓ Bien se laver les mains après un contact à risque et avant de préparer le repas.
- ✓ Eviter toute pratique sexuelle oro-anale .
- ✓ Laver les légumes avec de l'eau purifiée ou préalablement bouillie.
- ✓ Prévenir le patient du risque supérieur encouru lors de voyage à l'étranger, notamment dans les pays en voie de développement.

Pour un individu déjà atteint, il s'agira de ne pas transmettre ses oocystes à d'autres individus et il conviendra d'adopter une hygiène stricte des mains, d'éviter les pratiques sexuelles à risque et d'éviter de nager dans les lieux publics.

V.2- Prévention collective

V.2.1- Mesures de prévention des contaminations liées au bétail

Elles pourraient jouer un rôle majeur dans le contrôle des épidémies de cryptosporidiose d'origine animale. En effet, lors de l'épidémie de fièvre aphteuse au Royaume-Uni en 2001, les mesures drastiques de prévention adoptées à cette époque ont permis de constater une diminution de 81,8% des cas humains de cryptosporidiose par rapport à l'année précédente (Ramirez, Ward *et al.* 2004).

Les mesures idéales à adopter chez le bétail afin de réduire les contaminations seraient les suivantes (Ramirez, Ward *et al.* 2004) :

- utilisation de désinfectants efficaces (**Annexe 11**) par exemple des solutions ammoniaquées à 5%
- isolement des animaux malades
- ingestion du colostrum chez le nouveau né
- éviter les conditions de surpopulation au sein des élevages
- éloigner les troupeaux des lacs et rivières
- éviter l'épandage du fumier à proximité des cours d'eau
- créer des zones végétales tampon entre cours d'eau et pâtures, qui pourraient retenir à elles seules jusqu'à 99,9% des oocystes en cas de précipitations normales.

Idéalement, la découverte d'un vaccin efficace serait une mesure importante de prophylaxie du bétail mais les données sont encore insuffisantes et la physiopathologie encore insuffisamment comprise.

V.2.2- Mesures de prévention des transmissions inter-humaines

D'un point de vue humain, les individus diarrhéiques seraient bien entendu invités à ne pas se baigner dans les piscines et jacuzzi ; par ailleurs, une douche préalable à la baignade serait la bienvenue, de même qu'un lavage des mains après défécation (Fayer 2004)...

V.2.3- Mesures de prévention des transmissions liées à l'eau

V.2.3.a- Eau de consommation

Il s'agit essentiellement des eaux de surface particulièrement susceptibles d'être contaminées par des oocystes d'origine humaine ou bovine ; l'eau des nappes phréatiques présentant un risque moindre de contamination (Centers for Disease Control and Prevention 1997; Xiao, Fayer *et al.* 2004).

Les techniques de purification classiquement utilisées regroupent les mesures chimiques basées sur un traitement par le chlore qui, comme nous l'avons vu, est

d'action très lente et insuffisante sur les oocystes, et des mesures physiques associant floculation, sédimentation et filtration. La floculation semble être l'étape cruciale d'élimination des protozoaires en général et des oocystes en particulier car les filtres situés en aval de la chaîne de purification ne peuvent assurer à eux seuls une bonne efficacité vis à vis des cryptosporidies.

La surveillance de l'eau filtrée s'effectue par mesure de la turbidité et par recherche de marqueurs de contamination fécale tels que les bactéries coliformes. Toutefois, ces éléments sont peu révélateurs car les techniques de purification utilisées sont efficaces sur ces paramètres mais beaucoup moins sur l'élimination des cryptosporidies.

Par ailleurs, la simple détection d'oocystes à ce niveau ne préjuge pas de leur caractère infectieux. En outre, le risque lié aux oocystes contenus dans l'eau de consommation est probablement surestimé dans les études car toutes les espèces de cryptosporidies ne présentent pas un même risque infectieux chez l'Homme (Xiao, Fayer *et al.* 2004). L'avènement des techniques de biologie moléculaire avec détermination des espèces devrait permettre de mieux appréhender ce risque.

Aux USA (Centers for Disease Control and Prevention 1997), un système de surveillance de l'eau de distribution des municipalités de plus de 100 000 personnes est instauré depuis 1997 et associe l'E.P.A. (Environmental Protection Agency) et l'I.C.R. (Information Collection Rule). Un plan de coordination locale existe et précise les moyens de surveillance épidémiologiques, les moyens d'action et les modalités de coordination des principaux acteurs de santé publique (médecins, pharmaciens, urgences médicales, nurseries, laboratoires, épidémiologistes) (**Annexe 12**).

En France, les autorités sanitaires considèrent qu'il est économiquement impossible d'instaurer une surveillance systématique du réseau de distribution. Les recherches doivent rester circonscrites et adaptées à la situation épidémique (Di Palma *et al.* 2003).

V.2.3.b- Eaux de loisir

Les eaux de loisirs représentent un risque infectieux non négligeable et peu maîtrisable. Les systèmes de filtration utilisés même correctement sont en partie inefficaces et les contaminations successives par différents excréteurs d'oocystes rendent la tâche *quasi* impossible.

V.2.4- Surveillance des cas humains de cryptosporidiose

Aux USA, les médecins sont encouragés à prescrire des recherches de cryptosporidies même chez l'immunocompétent (Centers for Disease Control and Prevention 1997).

Les laboratoires sont également encouragés à s'impliquer davantage en comptabilisant et en surveillant le nombre de demandes d'analyses de selles, en prenant contact avec les autorités sanitaires en cas d'accroissement de la demande d'analyses sur selles diarrhéiques, en encourageant les médecins prescripteurs à prescrire la recherche de cryptosporidies notamment lorsque de nombreux examens de différentes selles diarrhéiques restent sans étiologie retrouvée. Enfin, ils sont tenus d'avertir les autorités en cas d'augmentation du diagnostic de cryptosporidiose (Centers for Disease Control and Prevention 1997) (**Annexe 13**).

En France, un « réseau cryptosporidiose » a récemment été mis en place à l'initiative de l'Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (A.N.O.F.E.L.). Les cas de cryptosporidioses sont désormais soumis à une déclaration auprès de cette association *via* des fiches de renseignements épidémiologiques (**Annexe 14**). L'objectif est d'arriver à centraliser les souches isolées. Cette centralisation permettrait d'améliorer nos connaissances épidémiologiques concernant cette parasitose sur le territoire français. En effet, les études publiées menées en France restent rares dans la bibliographie, et les connaissances épidémiologiques restent l'apanage des pays anglo-saxons.

Pour résumer :

En l'absence de traitement efficace, la prévention constitue la pierre angulaire de la lutte contre cette parasitose.

La prévention individuelle s'adresse aux patients sévèrement immunodéprimés possédant moins de 200 lymphocytes T CD 4 par μL .

Les mesures de prévention collective visent à diminuer le risque d'épidémie de cryptosporidiose au sein de la population générale.

**TROISIEME PARTIE :
MISE AU POINT D'UNE
METHODE DIAGNOSTIQUE PAR
PCR F.R.E.T.**

I- INTERETS ET OBJECTIFS D'UNE PCR A VISEE DIAGNOSTIQUE

Comme décrit précédemment, la cryptosporidiose humaine présente de nombreuses facettes : elle concerne immunodéprimés et immunocompétents et peut apparaître sous différentes formes cliniques.

Les techniques dites classiques comme les méthodes de coloration demeurent subjectives et peu sensibles. La part de subjectivité est grande conduisant parfois à rendre des résultats sans qu'aucune technique de confirmation ne vienne étayer le diagnostic. Or la sûreté du diagnostic biologique conditionne la prise en charge du patient, tant dans le cas d'un diagnostic d'exclusion que dans celui de confirmation.

On le voit, une technique de détection objective et sensible trouverait aisément une place importante dans l'arsenal diagnostique disponible. La sensibilité se devrait d'être au moins égale, voire très supérieure, aux techniques classiques. Elle devrait être dotée d'une excellente spécificité érigeant en *quasi* certitude le diagnostic de cryptosporidiose.

Nul besoin de quantification car aucun élément à ce jour ne permet d'accorder une importance quelconque à la quantité d'oocystes excrétés, du moins pas de façon précise. La mise au point d'une PCR quantitative ne sera donc pas notre objectif, même si un apport semi-quantitatif pourrait être envisagé.

Une technique de PCR à visée clinique suppose la possibilité de détecter les six espèces potentiellement pathogènes pour l'Homme : *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* et *C. muris*. La possibilité de détecter d'autres espèces permettrait d'envisager son application à des études vétérinaires ou environnementales.

C'est donc surtout, outre la sensibilité, l'apport épidémiologique qui accorderait une supériorité indiscutable à cette technique. En effet, ni les méthodes microscopiques (on a vu combien l'absence d'éléments distinctifs entre les

oocystes des différentes espèces rendait la tâche impossible), ni les méthodes immunologiques au sens large ne sont capables de distinguer les différentes espèces de cryptosporidies entre elles.

L'intérêt épidémiologique d'une telle technique résiderait principalement dans la surveillance et l'anticipation des épidémies humaines de cryptosporidiose.

En outre, cette méthode, pour qu'elle gagne rapidement sa place, devra se montrer facilement interprétable, d'un coût raisonnable et ne pas présenter de difficulté majeure de réalisation.

La description d'une PCR rassemblant la plupart de ces caractéristiques a été publiée en 2002 dans le Journal of Clinical Microbiology (Limor, Lal *et al.* 2002). Elle est décrite comme capable de distinguer 11 espèces de *Cryptosporidium*.

La partie pratique de ce mémoire a donc été de l'adapter aux conditions matérielles du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes.

II- MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

II.1- Matériel de base

La mise au point d'une PCR adaptée aux cryptosporidies a trouvé son inspiration dans un article publié en 2002 dans le *Journal of Clinical Microbiology* par Limor *et al.*

II.1.1.- Méthode de PCR utilisée

Cette publication décrit une technique par PCR temps réel, basée sur l'amplification d'une séquence du gène du SSU-rRNA 18S des cryptosporidies. Elle utilise les techniques F.R.E.T. et l'analyse par courbes de fusion.

Le système F.R.E.T. (Fluorescence Resonance Energy Transfert) repose sur le principe des fluorophores Reporter et Quencher mais associé, contrairement aux systèmes Taqman[®] ou Beacon, deux sondes différentes. Celles-ci sont conçues pour se trouver sur le même brin d'ADN à une distance proche (1 à 5 bases) l'une de l'autre après fixation sur la séquence amplifiée. L'une d'elle est porteuse du Reporter en position 3'. L'autre appelée « sonde Sensor » est porteuse du Quencher en position 5' et porte un groupement phosphorylé en position 3' qui empêche son élongation par la polymérase.

Après excitation par une longueur d'onde λ_1 , le Reporter émet une longueur d'onde λ_2 qui va exciter le Quencher. Celui-ci absorbe la lumière émise et émet une lumière de longueur d'onde λ_3 (**Figure 20**).

La présence de la séquence à amplifier peut donc être déduite soit de la décroissance de la fluorescence de longueur d'onde λ_2 , soit de l'augmentation de la fluorescence de longueur d'onde λ_3 .

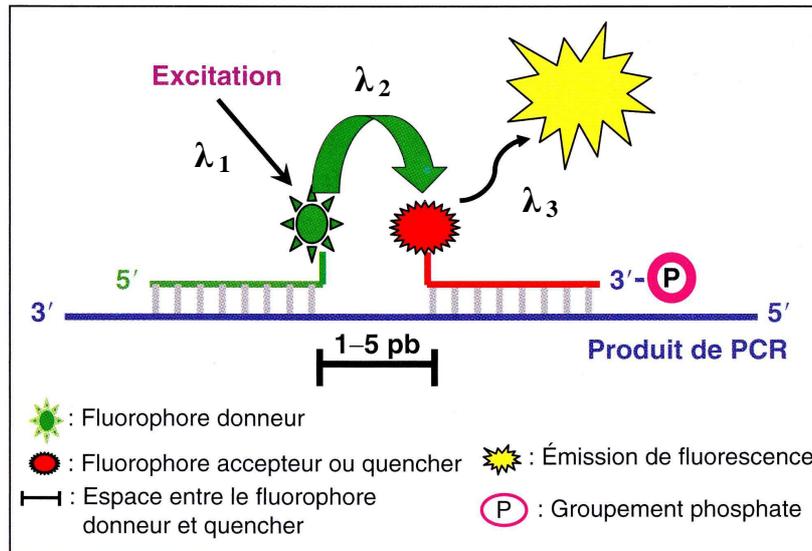


Figure 20: Principe du F.R.E.T. (Fluorescence Resonance Energy Transfert) (d'après Bogard *et al.* 2005)

II.1.2- Appareillage utilisé

La première différence entre la publication et les conditions matérielles locales est représentée par l'utilisation des thermocycleurs. Au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes, les thermocycleurs disponibles sont uniquement des Rotor Gene® de Corbett Research tandis que la méthode publiée est adaptée au Lightcycler® de Roche Diagnostic. Les différences d'utilisation se répercutent essentiellement :

- ✓ sur les durées des différentes étapes d'amplification qui doivent être allongées sur le Rotor Gene® par rapport au Lightcycler®, ce en raison des différences de rapidité d'homogénéisation thermique des échantillons
- ✓ et sur les fluorochromes utilisés, les canaux de lecture étant différents.

II.1.3- Echantillons utilisés dans le cadre de la mise au point de la technique

Tous les échantillons utilisés dans la publication sont des selles conservées à +4°C dans une solution de dichromate de potassium à 2,5% depuis moins de 12 mois.

Les échantillons utilisés dans le cadre de ce mémoire ont été divers :

II.1.3.a- Echantillons du CHU de Nantes

Les échantillons issus du CHU de Nantes et disponibles au laboratoire de parasitologie sont peu nombreux. Ils ont été conservés et mis de côté en fonction des diagnostics posés au fur et à mesure des examens de routine. Les selles positives ont été conservées en l'état à une température de +4°C. Il s'agit essentiellement d'échantillons de patient V.I.H. ayant présenté des examens directs positifs. Une évaluation semi-quantitative du nombre de cryptosporidies a été faite sur ces échantillons (**Tableau XXII**). Ils ont été utilisés pour la mise au point de la technique.

Les échantillons n'ont donc pas été conservés dans les mêmes conditions que dans la publication et pendant des durées plus importantes.

II.1.3.b- Echantillon du contrôle qualité

Un échantillon du contrôle national de qualité a été inclus.

II.1.3.c- Echantillons vétérinaires

Quatre échantillons aimablement fournis par le laboratoire vétérinaire et alimentaire départemental 54 (Meurthe et Moselle) ont été étudiés.

Patients	Année de naissance	Sexe	Statut VIH	CD4 /μL	Date de prélèvement	Examen direct ^a
Echantillons	Echantillons humains					
A	1967	M	+	24	09.10.2005	3
B	1965	F	+	1	05.10.2006	2
C	1964	F	+	8	27.04.2006	1
D	Contrôle qualité national					
E	1960	F	+	261	30.12.2006	1
F	1999	M	+	?	21.09.2004	3
G	1952	M	-	?	01.06.2007	4
H	1950	M	+	?	27.06.2005	1
I	1965	M	+	?	16.06.2005	3
	Echantillons vétérinaires					
J	Jeune veau				14.05.2007	3
K	Jeune veau (8 à 15 jours de vie)				?	2
L	Jeune veau				14.05.2007	2
M	Jeune veau				02.12.2006	3

Tableau XXII: Tableau récapitulatif des échantillons de selle positifs inclus dans la mise au point de la technique.

Pour les patients ayant eu des examens réitérés, seule une selle a été incluse dans la mise au point.

^a : Résultats de l'examen direct :

4 : très nombreuses cryptosporidies

3 : nombreuses cryptosporidies

2 : quelques cryptosporidies

1 : rares cryptosporidies

II.1.4- Extraction

C'est une étape pré-analytique essentielle. Elle vise à extraire du milieu étudié les acides nucléiques qui y sont présents dans l'espoir d'y trouver celui de l'organisme recherché.

Elle doit être adaptée à chaque micro-organisme, en fonction de sa structure et de sa résistance.

L'extraction décrite dans la publication est réalisée par digestion alcaline à 65°C pendant 15 minutes suivie d'une neutralisation par de l'acide chlorhydrique, puis d'une extraction par la technique du phénol-chloroforme. Enfin, une étape de purification par le kit QIAmp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen) est effectuée.

Ce type d'extraction paraît impossible à utiliser en technique de routine. Les recherches bibliographiques effectuées sur les techniques d'extraction

couramment utilisées montrent l'utilisation de kits classiques d'extraction (Jongwutiwes, Tiangtip *et al.* 2002; Tiangtip et Jongwutiwes 2002) plus ou moins associés à des techniques particulières : digestion enzymatique prolongée (Guyot, Follet-Dumoulin *et al.* 2001) ou ruptures des parois parasitaires par trois cycles successifs de congélation-décongélation dans des bains d'azote liquide (Neira-Otero, Munoz-Saldias *et al.* 2005). Les techniques appliquées à la détection des cryptosporidies dans l'environnement font le plus souvent appel à l'utilisation de micro-billes magnétisables (IMS), de coût très élevé et adaptées à des milieux très riches en substances inhibitrices que sont les prélèvements environnementaux.

Il a été décidé pour ce mémoire d'utiliser des kits classiques d'extraction plus ou moins agressifs : l'un adapté à l'extraction classique des selles (Kit QIAmp[®] DNA Stool Qiagen), les deux autres adaptés à l'extraction de tissus nécessitant des digestions cellulaires importantes (QIAmp[®] Tissue de Qiagen et Nucleospin[®] Genomic DNA from Tissue de Macherey Nagels) (**Annexe 15**), le tout en comparaison d'une technique associant cycles de congélation-décongélation dans l'azote liquide suivie d'une extraction par ces mêmes kits. L'étape de digestion par la protéinase K a été portée à 12 heures au lieu des 3 heures car il a été décrit une sensibilité particulière de la paroi des cryptosporidies à l'action de cette protéinase (Carey, Lee *et al.* 2004).

Les cycles de congélation-décongélation ont été effectués au laboratoire de parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Nantes. L'utilisation de tubes adaptés de type Nunc[®] Cryo Tube a été nécessaire, suite à quelques expériences explosives liées au phénomène de compression et décompression des gaz contenus dans les tubes... Rappelons que l'utilisation d'azote liquide est soumise à des précautions particulières avec utilisation de gants et masques cryoprotecteurs. La présence d'une ventilation importante est également obligatoire, compte tenu des volumes excessivement importants de gaz susceptibles d'être libérés par la vaporisation de faibles volumes d'azote liquide. Le risque principal est l'asphyxie du manipulateur par diminution de la teneur en oxygène de l'air ambiant.

II.1.5- Séquence amplifiée

La séquence sur laquelle est basée la technique est une séquence du gène du SSU-rRNA 18S d'environ 820 paires de bases (pb). Cette séquence est particulièrement intéressante car les études qui ont été menées sur ce gène ont montré son aptitude à différencier les espèces de cryptosporidies tout en étant relativement stable. La longueur de la séquence est extrêmement importante (820pb) pour une analyse par PCR en temps réel et on peut d'ores et déjà supposer que la polymérase utilisée, et dont la nature exacte n'est pas précisée dans l'article, devra faire preuve d'une endurance certaine. Nous avons été amenés à tester différentes polymérases, toutes ne montrant pas la même efficacité.

Une variété de polymérase appelée « Hot-Start » a été utilisée. Elle correspond à l'utilisation d'une polymérase dont l'activité est bloquée par des anticorps anti-Taq à température ambiante mais dont l'activité est révélée par la chaleur élevée voisine de 90°C conduisant à la libération de l'emprise des anticorps (**Figure 21**).

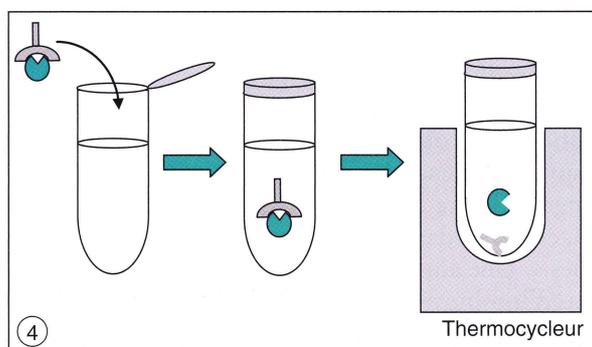


Figure 21: Principe de la polymérase « Hot-Start » dont l'action est inhibée à froid par des anticorps (Bogard *et al.* 2005)

II.1.6- Amorces

Les amorces utilisées sont décrites dans l'article et n'ont pas été modifiées. Il s'agit de l'amorce 1 :

5'- GGA-AGG-GTT-GTA-TTT-ATT-AGA-TAA-AG- 3'

Sa température théorique de fusion est de 68°C, soit une température d'hybridation optimale de 49.7°C (données fabricants).

La deuxième amorce est :

5'- AAG-GAG-TAA-GGA-ACA-ACC-TCC-A- 3'

Sa température théorique de fusion est de 64°C, soit une température d'hybridation optimale de 50.8°C (données fabricant).

Elles sont utilisées dans la publication à une concentration de 400 nM.

Nos amorces ont été commandées à Eurogentech® SA, livrées lyophilisées et reconstituées avec de l'eau stérile selon les indications du fournisseurs. Elles ont été aliquotées, à des concentrations de 100µM et 5µM, et conservées en pièce pré-PCR à -20°C.

II.1.7- Nucléotides

L'article indique l'utilisation de tous les déoxynucléosides nécessaires à la concentration de 100µM chacun.

Nous avons choisi de travailler avec du dUTP plutôt que du dTTP, avec utilisation d'uracyl-N-glycosylase (UDG), visant à limiter les contaminations au sein du laboratoire.

Les dNTPs ont été commandés au laboratoire Q-BIOgene® à la concentration de 100µM. Ils ont été dilués de façon à obtenir des aliquots à 5µM de concentration. Ces aliquots ont été congelés à -20°C en structure pré-PCR.

II.1.8- UDG

L'uracyl-N-glycosylase est une enzyme qui peut être introduite dans le mélange réactionnel et qui vise à éliminer tous les amplicons contenant du dUTP (Espy, Uhl *et al.* 2006). Il faut dans ce cas travailler avec du dUTP au lieu de dTTP.

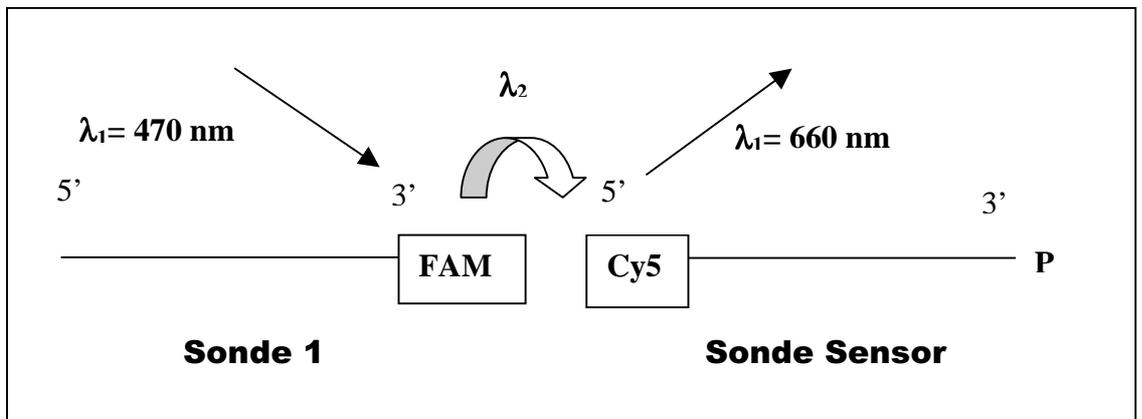
L'UDG a été commandée chez Invitrogen®, et congelée à -20°C dans la pièce dédiée à la préparation des mélanges réactionnels.

II.1.9- SYBR® Green

Il s'agit d'un agent intercalant s'insérant dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN. En s'insérant ainsi et après excitation par une longueur d'onde précise, il émet une fluorescence verte mesurable en fin d'élongation. La détection et l'augmentation de fluorescence au sein du milieu réactionnel correspond alors à la présence d'ADN double brin, quelle que soit sa nature (**Figure 22**). Il peut s'agir du produit d'amplification du gène recherché ou d'un produit non spécifique, comme des dimères d'amorces par exemple.

L'avantage de ce marqueur fluorescent réside essentiellement dans sa grande facilité d'utilisation et sa maniabilité. L'inconvénient majeur en est son manque total de spécificité.

De façon à adapter la technique à notre thermocycleur, les fluorophores ont été modifiés et un système d'échange de type Cy5 excité par FAM a été choisi.



Sondes F.R.E.T. adaptées à l'automate Rotor Gene®

Les sondes utilisées sont les suivantes :

Sonde 1	5' CCG-TCT-AAA-GCT-GAT-AGG-TCA-GAA-ACT-TGA-ATG- <u>FAM</u> 3'
---------	---

La température théorique de fusion de cette première sonde est de 94°C pour une température optimale d'hybridation de 57,6°C (données fabricant).

Sonde 2	5' <u>Cy5</u> -GTC-ACA-TTA-ATT-GTG-ATC-CGT-AAA-G- <u>Phosphate</u> 3'
---------	---

La température théorique de fusion de cette seconde amorce est de 68°C pour une température optimale d'hybridation de 50,6°C (données fabricant).

Les sondes sont utilisées dans la publication à une concentration de 200nM.

Nos sondes ont été commandées à Eurogentech® SA, livrées lyophilisées et reconstituées avec de l'eau stérile selon les indications du fournisseurs de façon à obtenir une concentration de 100µM puis 5µM. Elles ont été aliquotées, et conservées en pièce pré-PCR à -20°C.

II.1.10- Magnésium

La concentration de $MgCl_2$ a été optimisée par les auteurs, la concentration de 4mM semblant la plus efficace.

La solution de $MgCl_2$ est fournie avec la polymérase. Elle a été aliquotée et congelée à $-20^{\circ}C$ dans la pièce dédiée à la préparation des mélanges réactionnels.

II.1.11- Témoins internes

Nous avons utilisé comme témoin d'inhibition un IPC commercialisé, destiné à être inclus dans le mélange réactionnel. Il contient tous les éléments nécessaires à sa propre amplification en dehors de la polymérase.

Les témoins négatifs d'extraction et post-extraction ont été réalisés en remplaçant l'échantillon ou l'extrait par de l'eau stérile.

II.1.12- Extraits

Les extraits sont utilisés en faible quantité dans la publication : 1 μL pour un volume réactionnel total de 20 μL , les volumes habituellement utilisé étant de 5 μL pour un volume total identique.

MgCl₂	4 mM
Amorces	400 nM
Sondes	200 nM
dNTPs	100 μM
Extrait	1 μL

Tableau XXIII: Tableau récapitulatif du mélange réactionnel selon Limor *et al.* 2002

II.1.13- Cycles de température

Les auteurs ont utilisé des cycles triphasiques se décomposant de la façon suivante : dénaturation à 94°C pendant 2 secondes, hybridation à 50°C pendant 10 secondes et élongation à 70°C pendant 15 secondes.

Le nombre de cycles décrit par les auteurs est très important puisqu'ils en effectuent jusqu'à 55, ce qui favorise théoriquement les amplifications non spécifiques. Ce nombre important de cycles leur a été utile pour atteindre des sensibilités très importantes dans le cadre de l'utilisation d'oocystes purifiés par gradient de concentration et dilués ; cet allongement de la durée des cycles est en effet plus aisément applicable en dehors des milieux biologiques classiques.

Nous tenterons d'atteindre un nombre convenable de cycles, sans pour autant concéder une faible sensibilité.

II.1.14- Analyse des courbes de fusion

La publication précise que la technique est capable de détecter et de différencier les espèces de cryptosporidies en fonction de leur température de fusion (**Tableau XXIV**). En revanche cette technique n'est pas capable de détecter la présence de certaines espèces dont *C. andersoni* et *C. serpentis*, ce qui ne pose pas de problème du point de vue clinique.

Espèces et génotypes de <i>Cryptosporidium</i>	Températures de fusion (°C)
<i>C. hominis</i>	66,50
<i>C. parvum</i>	59,30
<i>C. parvum</i> génotype de la souris	59,20
<i>C. parvum</i> génotype des marsupiaux	56,60
<i>C. parvum</i> , génotype du furet	55,61
<i>C. wrairi</i>	55,55
<i>C. canis</i>	58,04
<i>C. meleagridis</i>	62,40
<i>C. felis</i>	54,23
<i>C. baileyi</i>	58,38

Tableau XXIV: Espèces de *Cryptosporidium* détectées par la technique, en fonction de leur température de fusion (d'après Limor, Lal *et al.* 2002) (en gras les espèces rencontrées chez l'Homme)

La technique d'obtention des courbes de fusion est la suivante : suite aux cycles d'amplification, une phase de dénaturation rapide est effectuée. Une phase d'hybridation des sondes a lieu à basse température (45°C) puis la température est augmentée progressivement jusqu'à 80°C, tout en suivant les variations de fluorescence. La procédure appliquée à la mise au point de notre technique sera identique.

Les sondes F.R.E.T. ont en effet l'avantage de pouvoir fournir des renseignements de type qualitatif.

Rappelons que la température de fusion ou T_m correspond à la température à laquelle la sonde ou l'amorce se détache de sa partie nucléotidique complémentaire. Ce T_m est variable en fonction de la composition en C + G de la sonde mais aussi en fonction du taux d'affinité de la sonde pour son complément. Si la correspondance entre la sonde et la séquence est exactement identique, l'énergie (et donc la température) nécessaire à la séparation des deux brins sera plus élevée que dans le cas d'une correspondance partielle (cas observé en présence d'une mutation ou d'un variant génétique).

Ainsi, en fin de PCR, le mélange réactionnel, d'abord porté à la température d'hybridation des sondes, est soumis à des températures croissantes avec mesure de la fluorescence en parallèle. Lors du décrochage de la sonde Sensor, la fluorescence subit une variation brutale qui permet de définir le T_m de la sonde d'hybridation (Espy, Uhl *et al.* 2006). Celui-ci correspond à la température pour laquelle on observe une décroissance de 50% de la fluorescence initiale. On obtient des courbes dites de fusion (**Figure 23**).

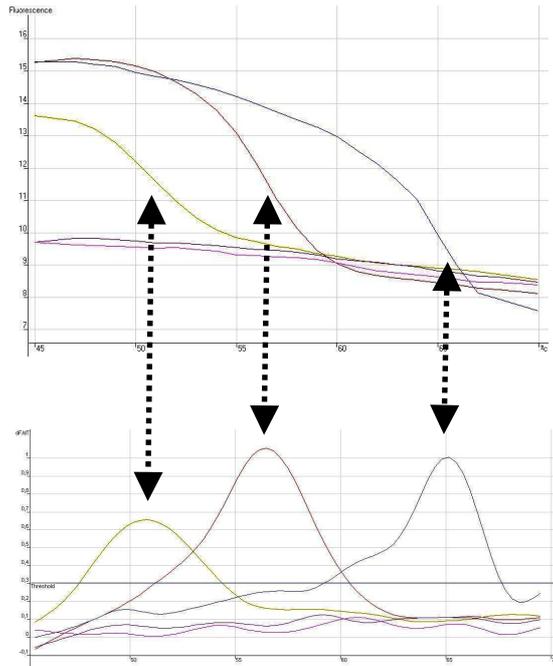


Figure 23: Exemple de courbes de fusion avant (en haut) et après (en bas) analyse des variations de fluorescence, obtenues par méthode F.R.E.T. Les flèches indiquent la correspondance entre l'inflexion de la courbe de fluorescence et l'interprétation en dérivée de la variation de la fluorescence. On est ici en présence de trois espèces de micro-organismes différents (en l'occurrence, trois espèces de cryptosporidies).

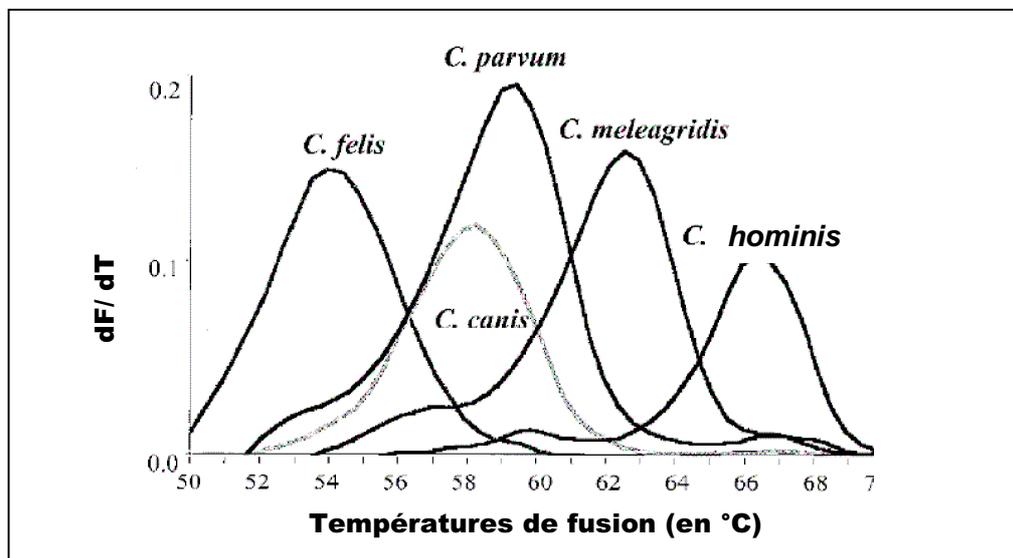


Figure 24: Aspect des courbes de fusion en fonction des espèces de cryptosporidies à détecter (d'après Limor, Lal *et al.* 2002).

Les températures de fusion seront à réévaluer en fonction des conditions opératoires qui seront les nôtres.

On remarquera que la température de fusion la plus élevée est relevée pour l'espèce *C. hominis* à 66,5°C, ce qui correspond à la température de fusion théorique de la sonde Sensor. En effet, celle-ci a été élaborée pour s'hybrider parfaitement avec la séquence SSU-rRNA 18S de cette espèce.

Un mésappariement de la sonde Sensor est relevé pour l'espèce *C. meleagridis*, qui présente la deuxième température de fusion la plus élevée ; quant à *C. parvum* et *C. canis*, on relève deux mésappariements de nature différente pour chacune des deux espèces et donc une température de fusion plus basse. Enfin, *C. felis* est l'espèce présentant le plus grand nombre de mésappariements et possède logiquement la température de fusion la moins élevée.

II.1.15- Gel de révélation

Le gel de révélation est un gel de polyacrylamide à 10%. Les marqueurs de poids moléculaires utilisés ont été les marqueurs V et VI (**Figure 25**).

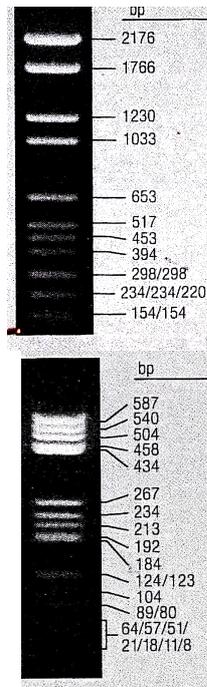


Figure 25 : Exemples de deux marqueurs de poids moléculaire utilisés dans les gels d'électrophorèse (marqueurs V et VI).

II.1.16- PCR cryptosporidies déjà existante

Une PCR de détection de cryptosporidies existe déjà au laboratoire de parasitologie basée sur l'amplification d'une toute autre séquence des cryptosporidies. Il s'agit cependant d'une technique de dépannage puisque peu sensible, et n'apportant pas d'élément épidémiologique. Elle a tout de même trouvé son utilité dans la mise au point de cette nouvelle PCR.

II.2- Mise au point

La première étape a consisté à travailler sur l'échantillon B contenant un nombre moyen de cryptosporidies. L'extraction a été réalisée par le kit QIAmp® de Qiagen et le mélange réactionnel utilisé a été identique à celui de la publication (**Tableau XXIII**).

Les temps de dénaturation, d'hybridation et d'élongation ont été adaptés respectivement à 15, 20 et 20 secondes. Aucune amplification n'a été observée malgré les essais d'allongement du temps d'élongation à 55 secondes ou de variations de concentration de MgCl₂ (**Tableau XXV**).

Nombre de cycles	Températures d'hybridation	Quantité d'ADN	Temps d'élongation	MgCl ₂	Révélation sur gel	Détection sur les courbes de fusion
40	50°C	1µL	20s	4mM	Neg	Neg
			55s	4mM	Neg	Neg
		5µL	55s	3mM	Neg	Neg
				4mM	Neg	Neg
				5mM	Neg	Neg
				6mM	neg	Neg

Tableau XXV: Premiers essais de PCR réalisés sur l'échantillon B après variations des quantités d'extrait, du temps d'élongation et des concentrations en MgCl₂. Aucune amplification n'a pu être obtenue.

Plusieurs problèmes pouvaient être évoqués :

- ✓ l'extraction avait-elle échoué ?
- ✓ le prélèvement était-il réellement positif ?
- ✓ la polymérase utilisée était-elle suffisamment efficace (vieillie ou pas assez endurante)?
- ✓ la quantité d'extrait (1µL) n'était-elle pas trop faible ?
- ✓ la concentration de MgCl₂ était-elle vraiment efficace dans nos conditions ?

Il n'y avait pas *a priori* à remettre en cause les concentrations d'amorces ou de sondes.

Après avoir renouvelé la Taq polymérase (Taq Platinum® Invitrogen), modifié les concentrations de MgCl₂, augmenté les temps d'hybridation et d'élongation à une minute et augmenté le nombre de cycles à 45, on n'observait toujours pas de signal fiable, si ce n'est un signal extrêmement faible et ininterprétable au niveau de la courbe de fusion, dans les conditions les meilleures (c'est-à-dire à une concentration de MgCl₂ de 4 mM) (**Tableau XXVI**). Le gel ne révélait pas de bande en position attendue mais une amplification aspécifique majeure.

Quantité d'extrait	Cycles	Durée d'hybridation	Durée d'élongation	MgCl ₂ (mM)	Gel	Détection sur les courbes de fusion
5µL	45	60s	60s	2	NS	Neg
				3	NS	Aléatoire
				4	NS	Aléatoire
				5	NS	Aléatoire
				6	NS	Neg
				7	NS	Neg
				8	NS	Neg
				9	NS	Neg

Tableau XXVI: Résultats obtenus sur l'échantillon B après renouvellement de la polymérase et de la solution de MgCl₂. Les résultats obtenus ne sont pas interprétables. NS : Amplification non spécifique

II.2.1- Extraction

L'extrait obtenu par le kit QIAmp® de Qiagen a été analysé avec la technique PCR classique du laboratoire et n'a pas montré d'amplification. La responsabilité de l'échec précédent a donc été mise sur le compte de l'extraction. Un nouvel essai a été réalisé avec le kit QIAmp® Tissue de Qiagen qui a été un échec, avant d'utiliser le kit Nucleospin® de Macherey-Nagel .

Les trois selles A, B et C contenant respectivement de nombreuses, quelques ou de rares cryptosporidies ont été extraites parallèlement soit par le kit Nucleospin[®] Macherey Nagel seul, soit par l'association azote liquide-kit Nucleospin[®] Macherey Nagel.

La PCR classique a été utilisée et a montré l'existence du génome de cryptosporidies dans l'échantillon A, qu'il ait été traité par azote au préalable ou non (**Figure 26**).

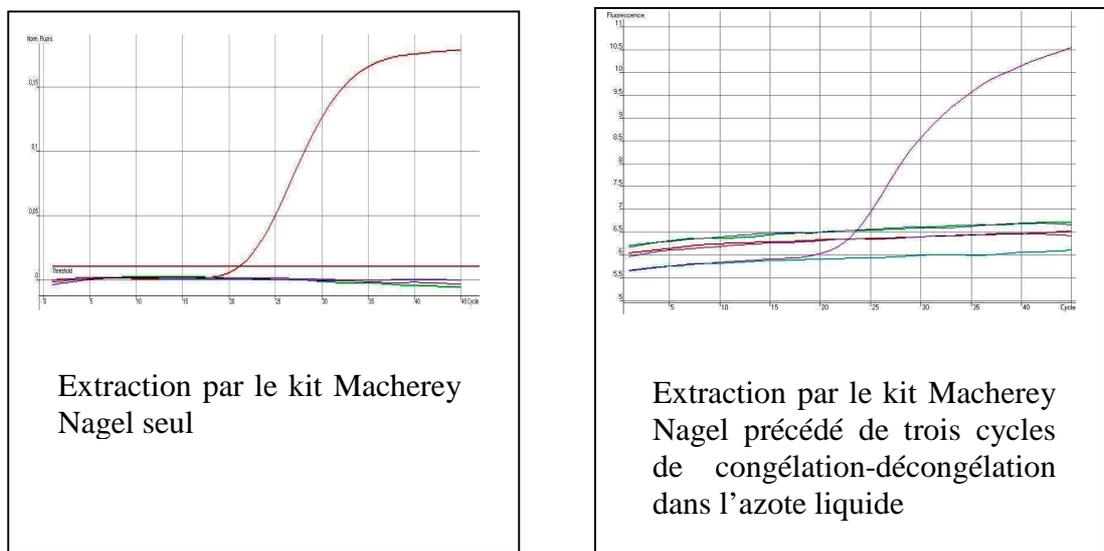


Figure 26 : Résultats des PCR « classiques » sur les extraits A, B et C par extraction Macherey Nagel, précédée ou non de cycles de congélation-décongélation dans l'azote liquide.

L'extraction avait donc bien fonctionné pour l'échantillon A et vraisemblablement pour les autres extractions, l'absence de détection pouvant être mise sur le compte de la sensibilité médiocre de cette PCR.

L'apport de l'étape préalable de congélation-décongélation ne pouvait pour l'instant pas être évalué.

II.2.2- Adaptation de la PCR

L'extraction ayant montré une efficacité, l'extrait A, dont nous étions sûrs qu'il contenait le génome des cryptosporidies, a été utilisé dans des conditions classiquement retrouvées au sein des laboratoires du plateau technique pour le même type de PCR F.R.E.T. temps réel et correspondant à ceux décrits dans la publication de référence mis à part la quantité d'extrait portée à 5 μ L soit : (Tableau XXVII).

Eléments	Concentration
Tampon 10X	1X
MgCl₂	4 mM
UDG	0.02 U
Amorce 1	0.4 μ M
Amorce 2	0.4 μ M
Sonde 1	0.2 μ M
Sonde 2	0.2 μ M
dATP	100 μ M
dUTP	100 μ M
dCTP	100 μ M
dGTP	100 μ M
IPC 10X	1 X
IPC 50X	0.5 X
Taq gold	1 U
Extrait	5 μ L
Eau	qsp 20 μ L

Tableau XXVII: Mélange réactionnel utilisé

Les températures de dénaturation, d'hybridation et d'élongation ont été conservées par rapport à la publication (Tableau XXVIII).

Etapes		T (°C)	Temps
Activation de l'UDG		50°C	2 minutes
Dénaturation		94°C	10 minutes
45 cycles	Dénaturation	94°C	15s
	Hybridation	50°C	20s
	Elongation	72°C	20s
Dénaturation			1 minute
Hybridation		45°C	1 minute
Ascension thermique		45-80°C	

Tableau XVIII : Présentation des étapes thermiques lors de l'amplification

Les concentrations de $MgCl_2$ ont été utilisées à 3, 4, 5 et 6mM (**Figures 27 et 28**).

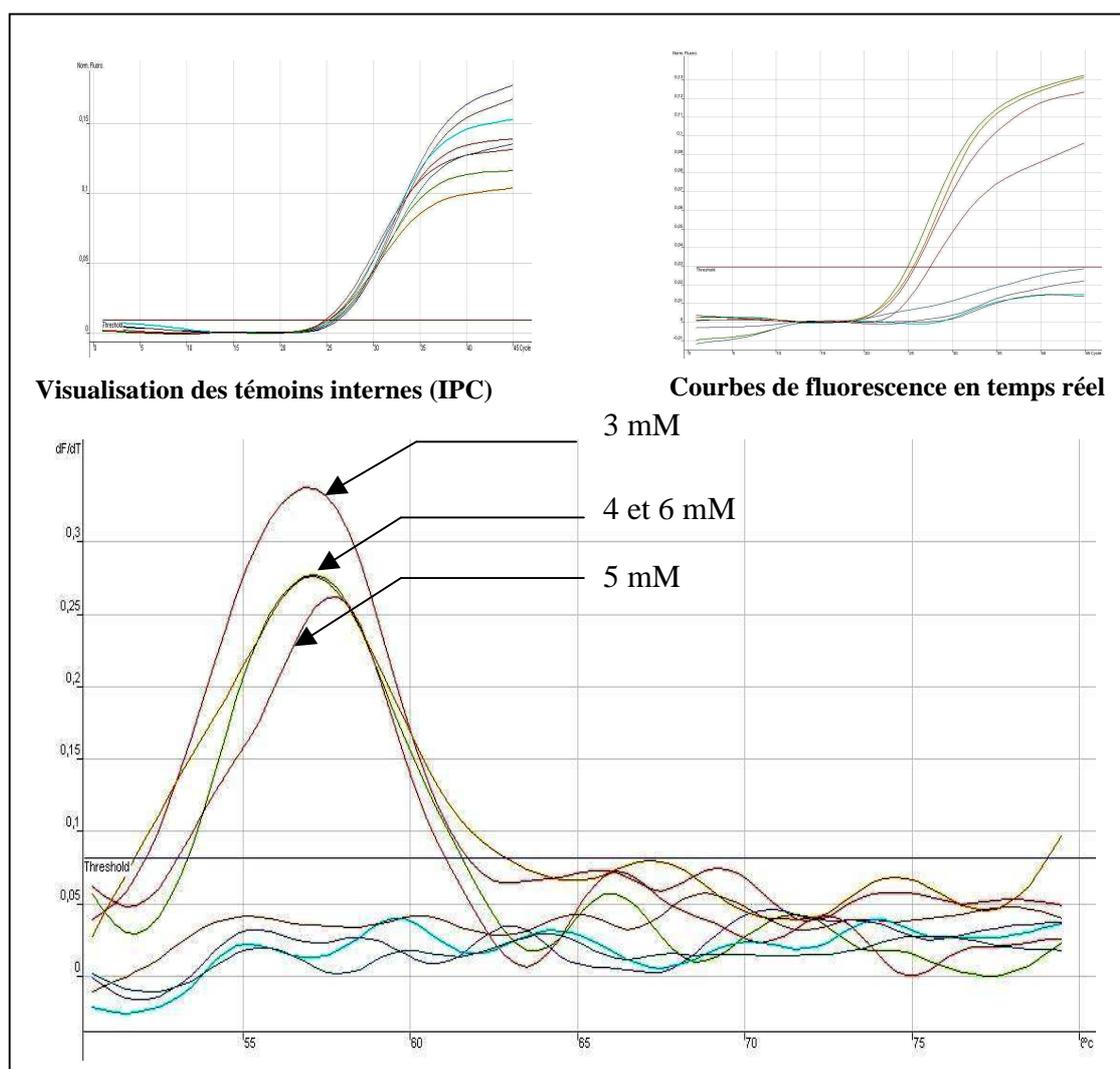


Figure 27 : Courbes de fusion de l'échantillon A en fonction de la concentration du milieu en $MgCl_2$. Les schémas du haut représentent les témoins internes et les courbes de fluorescence en temps réel.

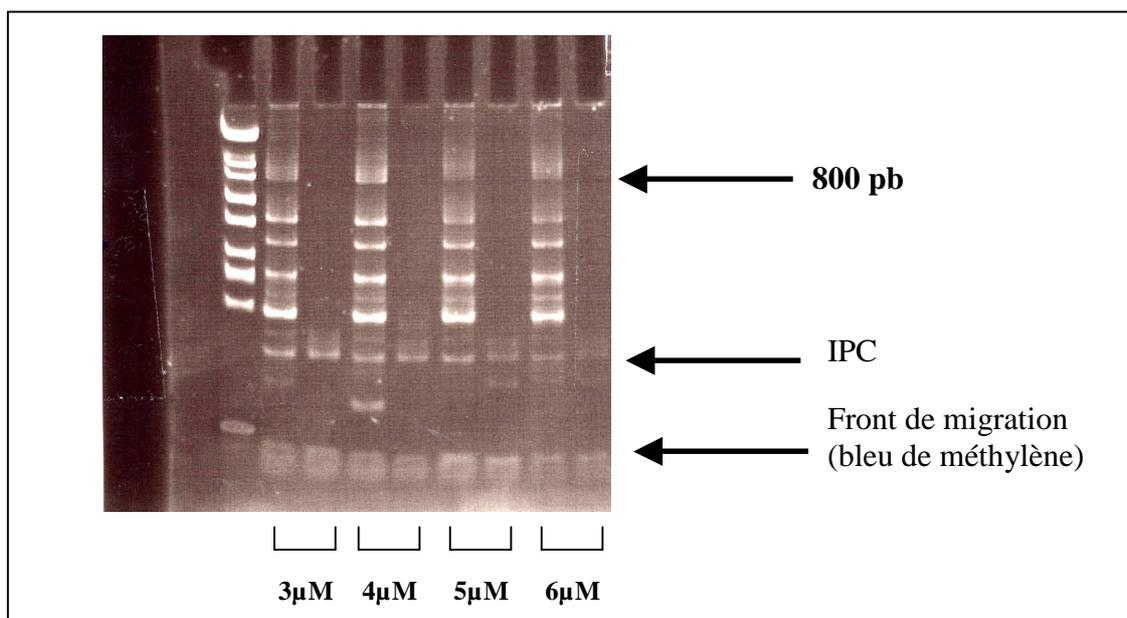


Figure 28 : Visualisation sur gel des produits d’amplification en fonction de la concentration du milieu en $MgCl_2$ (température d’hybridation= $50^{\circ}C$)

L’amplification est nettement aspécifique puisque de nombreuses bandes sont présentes sur le gel et la variation des concentrations de $MgCl_2$ n’y change pas grand chose. La concentration de **4mM** sera utilisée par la suite.

Les courbes de fusion donnent un pic à $57^{\circ}C$ proche du théorique $59^{\circ}C$ du *C. parvum*. Cependant, aucun séquençage n’est possible en l’absence d’amplification suffisamment spécifique.

II.2.3- Adaptation des températures d’hybridation

L’amplification non spécifique est liée au manque de stringence du milieu réactionnel. Les températures d’hybridation des amorces sont certes voisines de $50^{\circ}C$ mais leur température de fusion est tout de même voisine de $64^{\circ}C$ pour la plus basse. Il existe donc une marge de manœuvre pour les températures d’hybridation utilisables (**Tableau XXIX**) :

Température d'hybridation	Aspect de l'amplification après révélation sur gel	Détection des courbes de fusion
50°C	Non spécifique	Oui (faible)
52°C	Non spécifique	Oui (faible)
54°C	Non spécifique	Oui (faible)
56°C	Assez spécifique	Oui
58°C	Spécifique	Oui
60°C	Spécifique	Oui
62°C	Spécifique	Oui (faible)
64°C	Absence d'amplicon	Non

Tableau XXIX: Essais de variation des températures d'hybridation sur l'extrait A

La température semble être un facteur déterminant de la spécificité de la réaction et la température de 60°C semble être la plus adaptée (Figure 29).

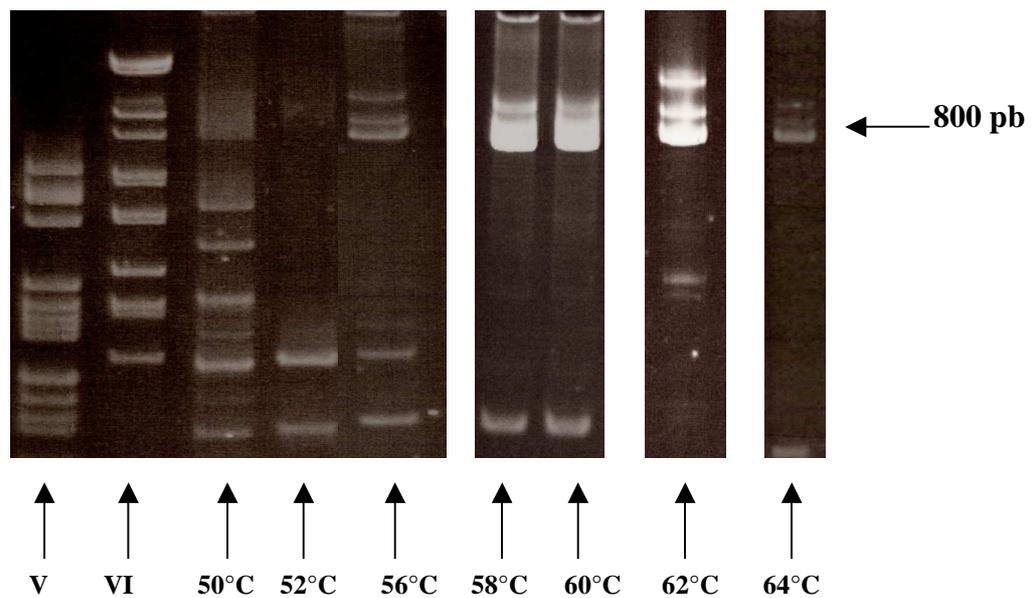


Figure 29: Essais d'amplification menés sur l'échantillon A. La spécificité de la réaction est augmentée parallèlement à la température d'hybridation. Une température supérieure à 62°C ne permet quasiment plus l'hybridation et donc l'amplification de la séquence.

La température donnant la meilleure spécificité est comprise entre 58 et 62°C .
La température de 60°C a été choisie pour la suite.

En revanche, en travaillant à la température de 60°C lors de la phase d'élongation, la fluorescence en temps réel ne peut plus être exploitée pour détecter l'ensemble des espèces de cryptosporidies. A cette température, les sondes fluorescentes ne peuvent plus s'hybrider sur les séquences des espèces pour lesquelles la sonde Sensor a le plus de mismatches (*C. felis*, *C. canis*, *C. parvum*), ce qui n'est pas le cas de *C. hominis* qui demeure détectable en temps réel, la sonde Sensor ne se détachant qu'au delà de 65°C (**Figure 30**).

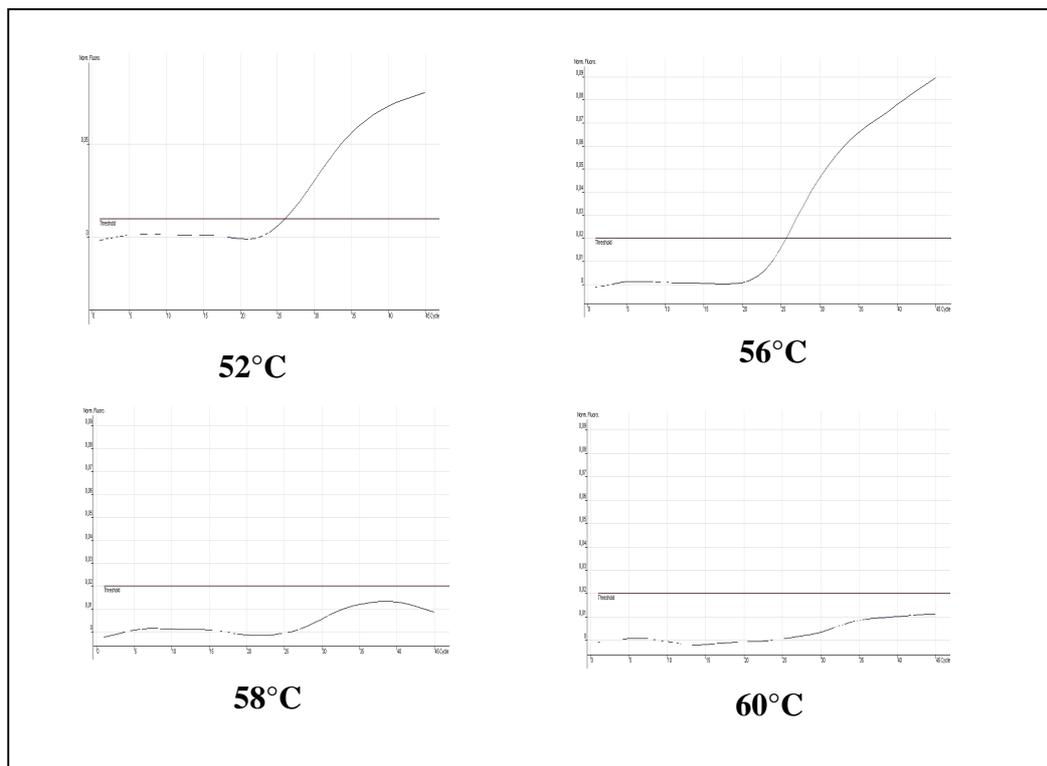


Figure 30: Disparition de la fluorescence lors de l'augmentation des températures d'hybridation. Une meilleure spécificité semble devoir s'accompagner d'une disparition du suivi de l'amplification en temps réel. (exemple de l'extrait A : *C. parvum*) Toutefois, le suivi en temps réel n'est pas indispensable si l'analyse demeure possible sur les courbes de fusion.

Quant aux échantillons B et C, ils ne sont pas sortis en PCR, que ce soit en suivi de fluorescence ou en température de fusion.

Par contre une bande de faible intensité peut être observée sur gel de façon aléatoire pour l'échantillon B (**Figure 31**).

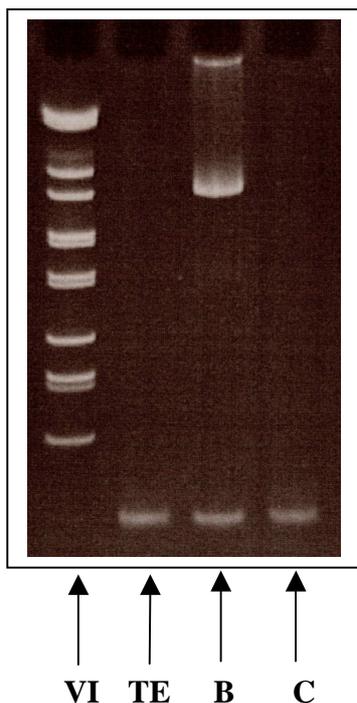


Figure 31: Révélation sur gel des échantillons B et C. L'extrait B est visualisable sur gel de façon aléatoire .

TE : Témoin d'extraction

VI : Marqueur de poids moléculaire

Le produit d'amplification B obtenu de façon aléatoire a été analysé en séquençage pour identification afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Le séquençage a été productif sur une partie de la séquence amplifiée. La comparaison avec les banques de données internationales a permis de conclure à l'espèce *C. felis* (**Figure 32**).

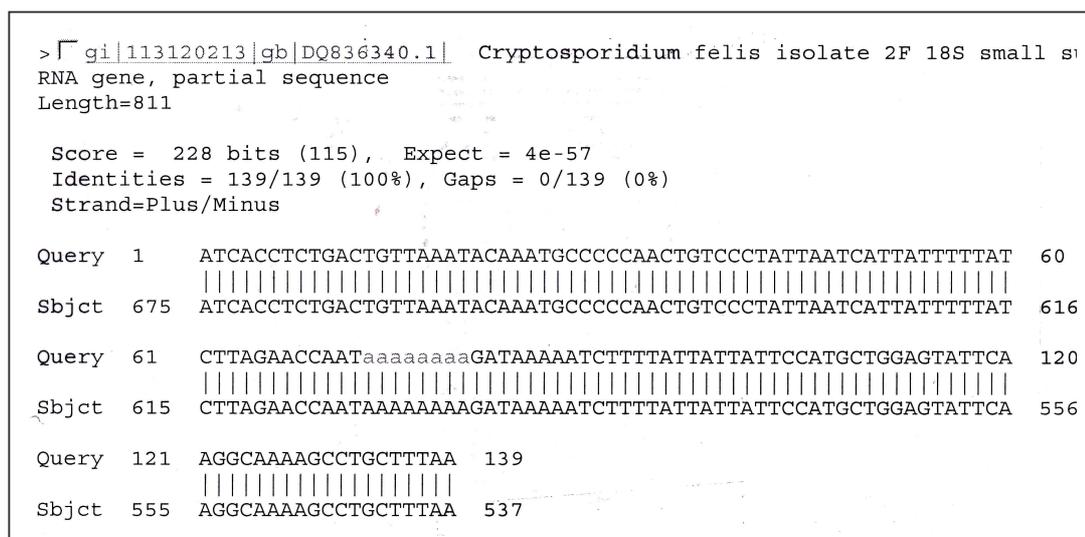


Figure 32: Résultat du produit de séquençage du produit d'amplification issu de l'extrait B. Il s'agit de *C. felis*, la détermination est excellente.

Malgré l'utilisation de concentrations variables de sondes (**Tableau XXX**), l'échantillon B n'est que faiblement sorti en fluorescence et toujours de façon aléatoire avec des pics ininterprétables au niveau des températures de fusion. Quant à l'échantillon C, il n'a toujours pas été possible de mettre en évidence la présence moléculaire de cryptosporidies. L'échantillon C étant un échantillon présentant de rares cryptosporidies, il est toutefois possible qu'il s'agisse d'un faux positif.

Concentrations en sondes (μM)	Aspect obtenu sur gel		Détection des courbes de fusion	
	Echantillon B	Echantillon C	Echantillon B	Echantillon C
0.05	Aléatoire	Pas d'amplicon	Aléatoire	Non
0.1	Aléatoire	Pas d'amplicon	Aléatoire	Non
0.2	Aléatoire	Pas d'amplicon	Aléatoire	Non
0.4	Pas d'amplicon	Pas d'amplicon	Non	Non
0.8	Pas d'amplicon	Pas d'amplicon	Non	Non

Tableau XXX: Essais de variation des concentrations de sondes F.R.E.T. afin de mettre en évidence de façon plus régulière et plus marquée la présence de *C. felis* dans l'échantillon B. Aucune amélioration n'a pu être constatée. L'augmentation des concentrations en sonde semble même pouvoir inhiber l'amplification. **La concentration de 0,1 μM sera conservée par la suite.**

L'utilisation d'une nouvelle Taq polymérase a été décidée : il s'agit en fait d'un prémix Ex-TaKaRa®, contenant tous les éléments nécessaires à la PCR (nucléotides, MgCl_2 , Taq polymérase « Hot Start ») mais de composition exacte connue du seul fabricant. La préparation du mélange réactionnel en est simplifiée puisqu'il suffit de rajouter les amorces convenables, les sondes et l'extrait, le tout pouvant être préparé à température ambiante.

Le mélange réactionnel est le suivant (**Tableau XXXI**) :

	Concentration finale	Volume en μL pour un tube
Tampon 2X	1X	10
Amorce 1	0,3 μM	1,2
Amorce 2	0,3 μM	1,2
Sonde 1	0,1 μM	0,4
Sonde 2	0,1 μM	0,4
Eau		1,8
Extrait		5
Volume total		20

Tableau XXXI: Mélange réactionnel testé avec le pré mix Ex-TaKaRa[®]

Le résultat a été flagrant : en utilisant les mêmes extraits, l'échantillon B est sorti de façon régulière et répétée sans problème à la fois sur gel et en lecture des courbes de fusion (**Figure 33**).

La température de fusion de l'échantillon B correspond à celle attendue (54,23°C) pour l'espèce *C. felis* : elle est basse (ici, 51,2°C).

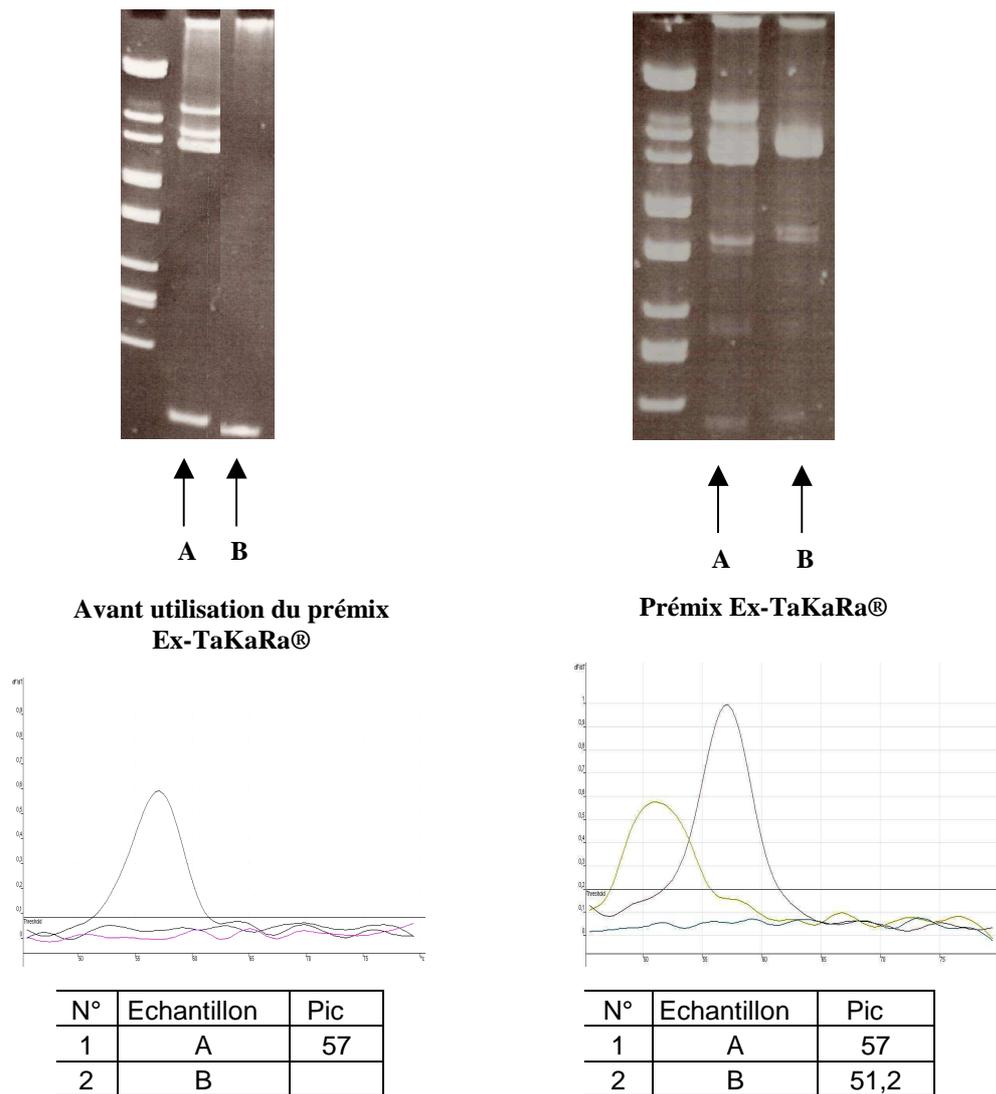


Figure 33 : Comparaison des deux polymérase Taq Platinum® et Ex-TaKaRa® sur les mêmes extraits A et B utilisés pour la mise au point de cette PCR. La nouvelle polymérase apparaît beaucoup plus efficace pour mettre en évidence le génome de *C. felis* dans l'extrait B.

La température de fusion observée pour l'échantillon D passé parallèlement correspondrait à celle de *C. hominis* (65.8°C) (**Figure 34**), comme confirmé par les résultats du contrôle qualité et par le séquençage (**Figure 35**).

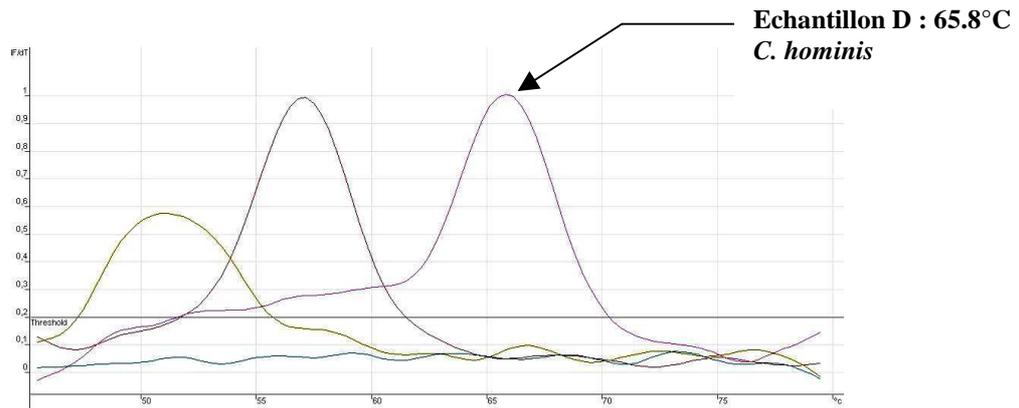


Figure 34 : Aspect des courbes de fusion des échantillons A, B et D après utilisation du prémix Ex-TaKaRa®.

```

>gi|146760789|gb|EF570922.1| Cryptosporidium hominis strain CHZF2 18S
ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=837

Score = 1171 bits (1298), Expect = 0.0
Identities = 649/650 (99%), Gaps = 0/650 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA 60
Sbjct 122 TATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA 181

Query 61 GCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCAAATFACCCAATCCCTA 120
Sbjct 182 GCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCAAATFACCCAATCCCTA 241

Query 121 ATACAGGAGGAGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTGGTTTGTAAATGGAAAT 180
Sbjct 242 ATACAGGAGGAGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTGGTTTGTAAATGGAAAT 301

Query 181 GAGTTAAGTATAAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 240
Sbjct 302 GAGTTAAGTATAAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 361

Query 241 GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT 300
Sbjct 362 GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT 421

Query 301 GGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATTTTGGTGAATTTTATATAATTAACATA 360
Sbjct 422 GGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATTTTGGTGAATTTTATATAATTAACATA 481

Query 361 attcatattactatTTTTTTTTtagtatatgaaatTTTactTTGAGAAAATTAGAGTGC 420
Sbjct 482 ATTCATATTACTATTTTTTTTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGC 541

Query 421 ttaaagcaggCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATAAAGATTTTATCTT 480
Sbjct 542 TTAAGCAGGATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATAAAGATTTTATCTT 601

Query 481 TTTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTT 540
Sbjct 602 TTTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTT 661

Query 541 AACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACARACTAATGCGAAAGCATTGGCC 600
Sbjct 662 AACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGGCC 721

Query 601 AAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATC 650
Sbjct 722 AAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATC 771

```

Figure 35: Identification par séquençage de l'espèce *C. hominis* dans l'extrait C après amplification par le mélange Ex-TaKaRa®.

La température de fusion de l'échantillon A correspondrait à celle de l'espèce *C. parvum*.

Le séquençage n'a pu être effectué car les bandes obtenues sont multiples quoique centrées autour de la zone attendue. Aucune amélioration n'a été obtenue malgré les variations des paramètres du milieu réactionnel et notamment des temps d'hybridation. Des essais ont été effectués de façon à minimiser les hybridations non spécifiques et ainsi tenter d'obtenir des bandes d'amplification uniques notamment pour l'échantillon A, ce qui en permettrait le séquençage et réduirait le temps de l'analyse.

Les temps d'hybridation ont été testés à 35, 25, 20, 15, 10 et 5 secondes. Un essai a été effectué à la température d'hybridation de 50°C pendant une durée courte (10 secondes) afin de minimiser les hybridations non spécifiques retrouvées à cette température (**Tableau XXXII**).

Temps d'hybridation	Qualité de l'amplification sur gel			Qualité des courbes de fusion		
	A ^a	B	D	A	B	D
Température d'hybridation de 60°C						
5s	++++	++ (Bande faible)	O	+++	+ ^b	O
10s	++++	++	++	+++	+ ^b	++
15s	++++	++	++	+++	+ ^b	++
20s	++++	+++	+++	+++	++	+++
25s	++++	++++	++++	+++	++	+++
30s	++++	++++	++++	+++	+++	+++
35s	++++	++++	++++	+++	+++	+++
Température d'hybridation de 50°C						
10s	NS	NS	NS	+++	++	+++

Tableau XXXII: Essais de différentes durées d'hybridation sur les échantillons A, B et D

^a : Persistance de trois bandes d'amplification centrées autour de la zone attendue, quelle que soit la durée d'hybridation appliquée

^b : Signal faible ininterprétable

O : Absence d'amplification ou de détection

NS : Amplification non spécifique

Qualité de l'amplification sur gel :

++ : bande de moyenne intensité

+++ : bande de forte intensité

++++ : bande de très forte intensité

Qualité des courbes de fusion :

+ : signal faible et ininterprétable

++ : signal suffisant pour l'interprétation mais de faible amplitude

+++ : signal interprétable et de bonne amplitude

Jusqu'à 10 secondes, l'amplification a lieu. La durée de 5 secondes ne permet plus de détection de certains échantillons (échantillon D) (**Figure 36**). Les trois bandes de détection de *C. parvum* de l'échantillon A demeurent, malgré la diminution du temps d'hybridation.

Le temps de 15 secondes donne d'excellent résultat en terme de spécificité de réaction (**Figure 37**) mais diminue le seuil de sensibilité de détection par température de fusion. **Une hybridation de 30 secondes constitue le meilleur compromis.**

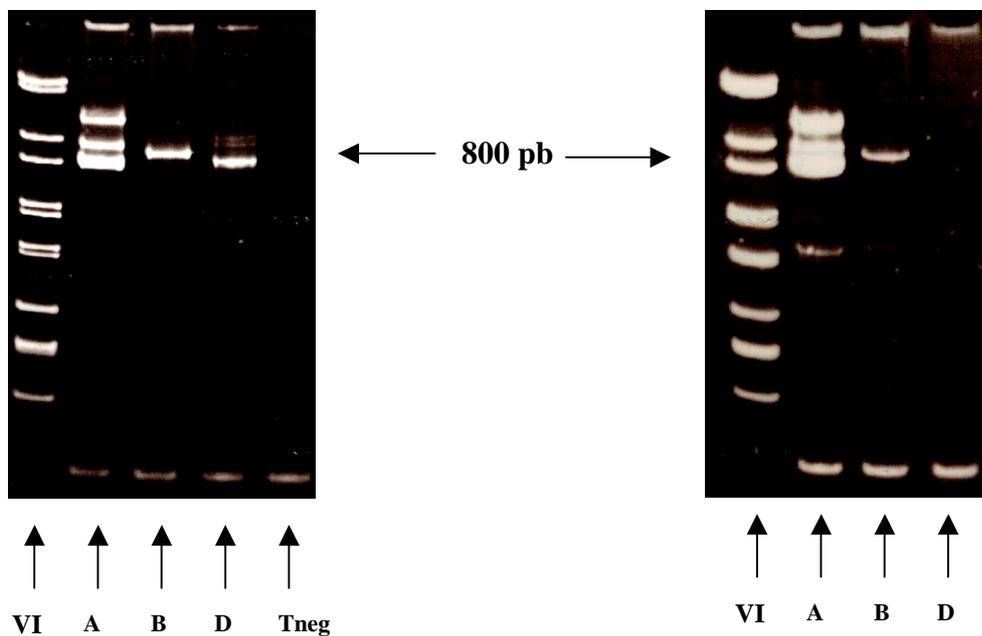


Figure 37 : Produits d'amplification obtenus avec une hybridation de 15 secondes. Le produit d'amplification de *C. parvum* présente toujours trois bandes distinctes, rendant le séquençage impossible.

Figure 36 : Produits d'amplification obtenus avec une hybridation de 5 secondes. L'amplification de l'échantillon D n'a pas eu lieu.

Cependant, les selles J, K, L et M issues de jeunes veaux ont montré la présence de courbes de fusion à une température équivalente voisine de 56°C. Au vu des données épidémiologiques existantes il s'agit très vraisemblablement de *C. parvum* (**Figure 38**).

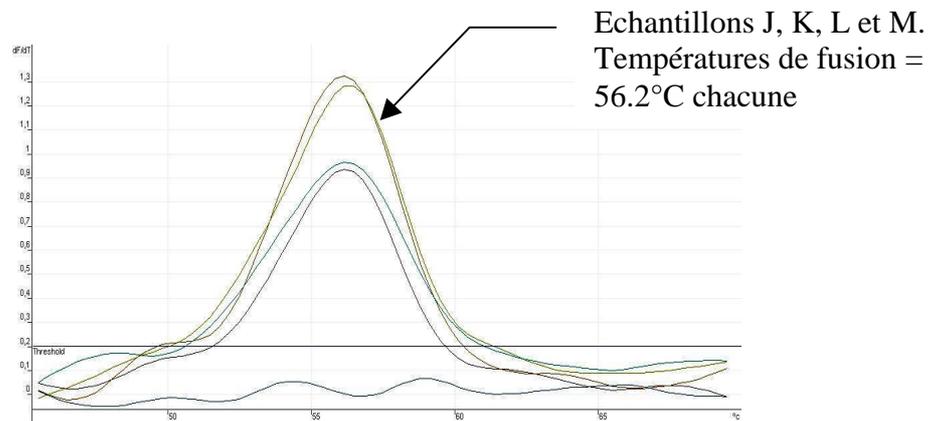


Figure 38: Résultat des courbes de fusion obtenues à partir des extraits de selles d'animaux (échantillons J, K, L et M). Il s'agit très vraisemblablement de *C. parvum*.

Les températures d'hybridation ont été à nouveau testées sur ce nouveau mélange réactionnel, la polymérase pouvant peut-être montrer une plus grande spécificité que celle préalablement utilisée, ce qui pourrait permettre une détection de la fluorescence en temps réel (**Tableau XXXIII**).

Le même résultat que précédemment a été retrouvé : le meilleur compromis entre spécificité et qualité de signal des courbes de fusion est obtenu pour une température d'hybridation de 60°C. La polymérase utilisée initialement était beaucoup moins performante dans des conditions semblables retrouvées au début des expérimentation. La qualité de cette enzyme apparaît réellement indispensable à la qualité de détection.

Températures d'hybridation	Aspect sur gel			Courbes de fusion		
	A	B	D	A	B	D
48°C	NS	NS	NS	+++	++	+++
50°C	NS	NS	NS	+++	++	+++
55°C	AS	AS	AS	+++	++	+++
58°C	S	S	S	+++	+++	+++
60°C	S	S	S	+++	+++	+++
62°C	S	S	S	I	I	I
64°C	S (faible)	Neg	Neg	I	I	I

Tableau XXXIII: Etude de l'impact des températures d'hybridation sur la spécificité de l'amplification et la détection des signaux. Les bandes d'amplification de l'extrait A demeurent multiples, quoique centrée autour de la zone attendue.

Qualité de l'amplification sur gel :

- Neg : Absence d'amplification
- NS : Amplification non spécifique
- AS : Amplification assez spécifique
- S : Amplification très spécifique

Qualité des courbes de fusion :

- ++ : Signal suffisant pour l'interprétation mais de faible amplitude
- +++ : Signal interprétable et de bonne amplitude
- I : Signal ininterprétable

Les essais de cycles biphasiques utilisant la température de 60°C en continu pour les étapes d'hybridation et élongation n'ont pas montré de meilleurs résultats. Cette méthode ne semble donc pas devoir être utilisée.

II.2.4- Optimisation du ratio entre les deux sondes

Des essais d'optimisation des concentrations de sonde entre elles ont été effectués (**Tableau XXXIV**). Ils ont montré une plus grande amplitude des courbes de fusion pour un rapport équimolaire entre les deux sondes, ce qui peut facilement s'expliquer au regard de la théorie.

Sonde 1 (μM)	Sonde 2 (μM)	Ratio S1:S2	Gel			Qualité des courbes de fusion		
			A	B	D	A	B	D
0.1	0.1	1 : 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0.1	0.2	1 : 2	+++	+++	+++	++	++	++
0.2	0.1	2 : 1	+++	+++	+++	++	++	++
0.15	0.05	3 : 1	+++	+++	+++	+	+	+
0.05	0.15	1 : 3	+++	+++	+++	++	++	++

Tableau XXXIV: Evaluation de l'impact du ratio des deux sondes F.R.E.T. sur la qualité de l'amplification et des courbes de fusion pour les échantillons A, B et D à une température d'hybridation de 60°C et utilisation du prémix Ex-TaKaRa®.

Qualité de l'amplification sur gel :

+++ : bonne amplification spécifique

Qualité des courbes de fusion :

+ : amplitude moyenne

++ : bonne amplitude

+++ : meilleure amplitude observée

II.2.5- Sensibilité de la technique

II.2.5.a- *C. parvum*

L'échantillon A correspondant très vraisemblablement à *C. parvum* a été dilué de demi en demi jusqu'à la dilution 1 / 4 096 précédé ou non d'un passage dans l'azote liquide. Les extraits ont été passés en technique F.R.E.T. et en technique SYBR® green et comparés en double-aveugle à l'observation microscopique par coloration de Ziehl-Neelsen modifiée et à une méthode immunochromatographique (RIDA® QUICK *Cryptosporidium*, R-Biopharm) (**Tableau XXXV et figure 39**).

Dilutions	Détection par technique FRET		Détection par SYBR green (Ct)		Détection par examen direct	Détection par immunochromatographie
	Azote	Sans azote	Azote	Sans azote		
Pur	Oui	Oui	14.1	14.61	Oui	Oui
1 / 2	Oui	Oui	14.55	15.3	Oui	Oui
1 / 4	Oui	Oui	15.62	15.84	Oui	Oui
1 / 8	Oui	Oui	16.58	15.6	Oui	Oui
1 / 16	Oui	Oui	17.15	17.29	Oui	Oui
1 / 32	Oui	Oui	19.26	19.11	Oui	Oui
1 / 64	Oui	Oui	19.8	21.51	Neg	Oui
1 / 128	Oui	Oui	20.94	21.33	Neg	Oui
1 / 256	Oui	Oui	22.11	22.06	Neg	Oui
1 / 512	Oui	Oui	22.51	23.45	Neg	Oui
1 / 1 024	Oui	Oui	23.96	24.31	Neg	Neg
1 / 2 048	Oui	Oui	25.62	26.45	Neg	Neg
1 / 4 096	Non*	Oui	Non*	25.27	Neg	Neg

Tableau XXXV: Tableau comparatif des différentes méthodes utilisées pour la détection des cryptosporidies présentes dans l'échantillon A (*C. parvum*) et ses dilutions successives

* : témoin interne positif

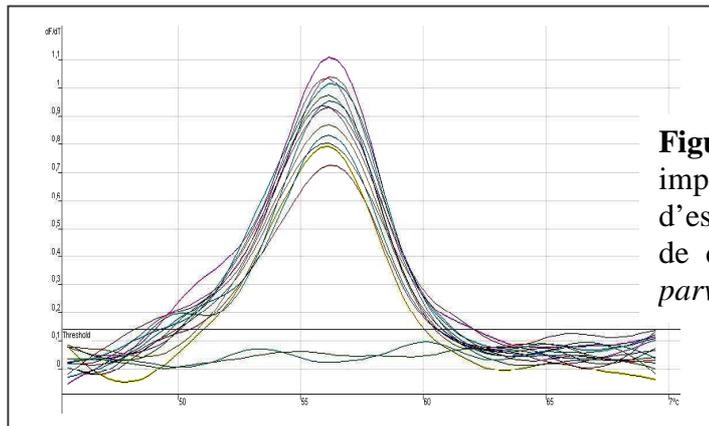


Figure 39: Malgré les dilutions importantes, l'identification d'espèce est aisée. Il n'y a pas de doute : il s'agit bien de *C. parvum*

Les différences de détection entre les deux techniques (précédée ou non d'azote liquide) sont minimales et ne procurent pas d'avantages à l'extraction précédée de bains d'azote liquide. Étant donné la lourdeur des cycles de congélation-décongélation, cette étape ne présentera pas d'intérêt réel en diagnostic de routine.

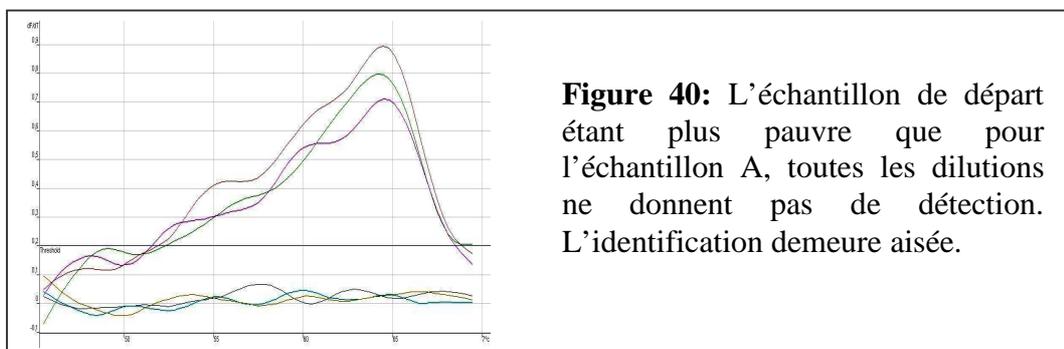
D'un point de vue comparatif, la sensibilité de la PCR FRET apparaît très supérieure aux techniques classiques (observation microscopique ou techniques immunochromatographiques).

II.2.5.b- *C. hominis*

L'échantillon D a été dilué de quart en quart et les extraits soumis à la PCR FRET ainsi qu'à l'observation microscopique comparative (**Tableau XXXVI et figure 40**)

Dilutions	Détection par technique	Détection par SYBR	Détection par examen
	FRET	green (Ct)	direct
	Sans azote	Sans azote	
Pur	Oui (Ct=34.58)	37	Oui
1 / 4	nr	nr	Oui
1 / 16	Oui (Ct=39)	40	Oui
1 / 64	Oui (Ct= 38.69)	37.3	Neg
1 / 256	Neg	Neg	Neg
1 / 1 024	Neg	Neg	Neg
1 / 4 096	Neg	Neg	Neg

Tableau XXXVI: Comparaison des sensibilités entre PCR F.R.E.T. et observation microscopique sur l'échantillon D (*C. hominis*) (nr : non réalisé)



II.2.5.c- *C. felis*

De la même façon, l'échantillon B a été dilué de quart en quart et les extraits soumis à la PCR FRET ainsi qu'à l'observation microscopique comparative (Tableau XXXVII et figure 41).

Dilutions	Détection par technique	Détection par SYBR	Détection par examen
	FRET	green (Ct)	direct
	Sans azote	Sans azote	
Pur	Oui	29.08	Oui
1 / 4	Oui	31.08	Neg
1 / 16	Oui	34.51	Neg
1 / 64	Oui	35.88	Neg
1 / 246	Neg	38.35	Neg
1 / 1 024	Neg	Neg	Neg
1 / 4 096	Neg	Neg	Neg

Tableau XXXVII: Comparaison des sensibilités entre PCR FRET et observation microscopique sur l'échantillon B (*C. felis*).

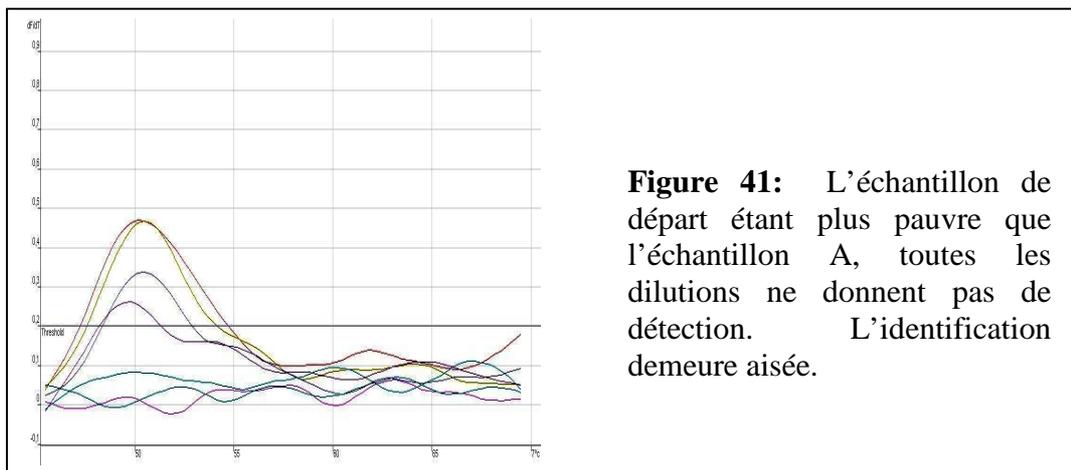


Figure 41: L'échantillon de départ étant plus pauvre que l'échantillon A, toutes les dilutions ne donnent pas de détection. L'identification demeure aisée.

II.3- Résumé des caractéristiques de la PCR (Annexe 16)

II.3.1- Extraction

L'extraction a lieu sur des échantillons de selles conservés au réfrigérateur à +4°C. Elle utilise le kit Nucleospin® de Macherey Nagel, sans cycles préalables de congélation-décongélation dans l'azote liquide.

La durée de la phase de digestion par la protéinase K est portée à 12 heures au lieu des 2 à 3 heures préconisés sur la notice du kit.

Les extraits sont ensuite congelés à -20°C ou soumis à amplification extemporanément.

II.3.2- Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est réalisé dans la pièce réservée à cet effet. Le mélange est le suivant (**Tableau XXXVIII**) :

	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes en μL
			1 tube
TAMPON 2X	2 X	1X	10
Amorce 1	5 μM	0,3 μM	1,2
Amorce 2	5 μM	0,3 μM	1,2
Sonde 1	5 μM	0,1 μM	0,4
Sonde 2	5 μM	0,1 μM	0,4
IPC Mix (amorces et sonde)	10 X	0,5 X	1
IPC 50X Applied	50 X	0,25 X	0,1
Eau			0,7

DNA extrait	5
Volume total	20

Tableau XXXVIII: Récapitulatif des éléments nécessaires au milieu réactionnel

Le mélange peut-être effectué à température ambiante, la polymérase étant une « Hot-Start ».

II .3.3- Cycles de températures

Le cycle thermique d'amplification choisi est présenté dans le **tableau XXXIX**:

Il est simplifié par l'absence d'étape d'activation de l'UDG.

Etapas		T (°C)	Temps
Dénaturation		94°C	10 minutes
45 cycles	Dénaturation	94°C	20s
	Hybridation	50°C	30s
	Elongation	72°C	30s
Dénaturation		95°C	15 s
Hybridation		45°C	30s
Ascension thermique		45-70°C	

Tableau XXXIX: Profil thermique des cycles d'amplification de la technique.

Le nombre total de cycles est porté à 45, ce qui semble être un maximum.

II.3.4- Lecture de la fluorescence en temps réel

Dans les conditions optimales, la lecture de fluorescence en temps réel s'est malheureusement révélée impossible. La température d'hybridation étant élevée, les sondes F.R.E.T. ne peuvent se fixer sur les séquences correspondant aux espèces pour lesquelles elles sont le moins adaptées. Ainsi, *C. hominis* sort en fluorescence, mais pas les autres espèces testées.

Ceci ne présente pas un inconvénient majeur puisque :

- ✓ la lecture interprétative des courbes de fusion nous permet de lire et de donner le résultat
- ✓ il n'existe pas un besoin de quantification des cryptosporidies dans les selles. L'existence d'un Ct n'est donc pas indispensable à l'interprétation.

II.3.5- Lecture des courbes de fusion

Les courbes de fusion nous permettent de désigner les échantillons positifs et de leur attribuer une identité d'espèce.

Elles semblent relativement faciles à lire et à interpréter, le pic semblant net.

Les températures de fusion en fonction des espèces trouvées sont les suivantes (Tableau XL) :

Espèces	Températures de fusion approximatives	Températures issues de la publication
<i>C. hominis</i>	65,5°C (valeurs extrêmes : 64 - 65.8°C)	66,5°C
<i>C. parvum</i>	57°C (valeurs extrêmes : 56.2 – 57.2°C)	59,30°C
<i>C. felis</i>	51°C (valeurs extrêmes : 50.3 – 51.5°C)	54,23°C

Tableau XL: Valeurs des températures de fusion constatées en fonction des différentes espèces trouvées, dans les conditions de travail du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes.

Les températures observées dans notre technique semblent moins élevées que les températures relevées dans la publication de départ. Ceci est certainement à mettre sur le compte des différences opératoires.

Elles devront être affinées empiriquement avec l'utilisation routinière de cette technique. Il semble nécessaire, du moins au début de l'utilisation de cette technique, d'employer des témoins positifs connus pour les espèces recherchées car lors d'une même série, une même espèce contenue dans différents échantillons présentera une température de fusion identique (à 0.1°C près).

II.3.6- Résultats des échantillons étudiés

II.3.6.a- Echantillons ayant servi à la mise au point de la technique

Les résultats sont présentés dans le **tableau XLI**:

Patients	Année de naissance	Sexe	Statut VIH	CD4 / μ L	Date de prélèvement	Examen direct *	Résultat de la PCR F.R.E.T.
Echantillons humains							
A	1967	M	+	24	09.10.2005	3	<i>C. parvum</i>
B	1965	F	+	1	05.10.2006	2	<i>C. felis</i>
C	1964	F	+	8	27.04.2006	1	Négatif
D	Contrôle qualité national						<i>C. hominis</i>
E	1960	F	+	261	30.12.2006	1	Négatif
F	1999	M	+	?	21.09.2004	3	<i>C. hominis</i>
G	1952	M	-	?	01.06.2007	4	<i>C. parvum</i>
H	1950	M	+	?	27.06.2005	1	Négatif
I	1965	M	+	?	16.06.2005	3	<i>C. parvum</i>
Echantillons vétérinaires							
J	Jeune veau				14.05.2007	3	<i>C. parvum</i>
K	Jeune veau (8 à 15 jours de vie)				?	2	<i>C. parvum</i>
L	Jeune veau				14.05.2007	2	<i>C. parvum</i>
M	Jeune veau				02.12.2006	3	<i>C. parvum</i>

Tableau XLI: Présentation des résultats obtenus par PCR F.R.E.T. sur les échantillons conservés au laboratoire de parasitologie de Nantes.

^a : Résultats de l'examen direct :

- 4 : très nombreuses cryptosporidies
- 3 : nombreuses cryptosporidies
- 2 : quelques cryptosporidies
- 1 : rares cryptosporidies

Le nombre d'échantillons étudiés est insuffisant pour tirer des conclusions épidémiologiques.

Cependant, il est intéressant de remarquer que les échantillons pour lesquels avaient été répondu la présence de rares cryptosporidies (C et E) ne sont pas détectés en PCR F.R.E.T. Au vu de la sensibilité de la technique, il semblerait qu'il s'agisse de faux positifs liés au caractère subjectif de la lecture de l'examen direct.

Par ailleurs, nous avons eu la chance de découvrir un *C. felis* parmi l'un des échantillons, ce qui, en regard de la littérature semble rarement mis en évidence mais pas exceptionnel. Il s'agit ici d'un patient V.I.H. très immunodéprimé (1 CD4/ μ L).

Cet échantillon nous a permis d'affiner la mise au point de cette technique et d'affirmer sa capacité à détecter cette espèce, l'amplitude de la courbe de fusion observée pour cette espèce étant moindre que celle observée pour les deux espèces majoritaires.

Par ailleurs, un échantillon issu d'un patient indemne du V.I.H. a montré la présence de *C. parvum*, observé en grande quantité à l'examen direct, montrant ainsi la possibilité de retrouver ces parasites chez ces individus, le patient ne présentant pas *a priori* de déficit immunitaire autre.

Les échantillons issus de bovins ont permis de montrer la présence de *C. parvum* et d'apporter un argument en faveur de la détection de cette espèce à une température de fusion voisine de 57°C.

III.3.6.b- Echantillons du Niger

Des échantillons de selles issus de la thèse de Anne Espern menée en 2006 (Espesn 2006) et portant sur les microsporidies ont été soumis à la technique F.R.E.T.

Ces échantillons avaient été collectés dans le cadre de l'I.N.A.A.R.V. (Initiative Nigérienne pour l'Accès aux Anti-Rétroviraux) sur une durée de 10 mois (novembre 2004 à août 2005) chez des patients séropositifs pour le V.I.H. suivis à Niamey. Les patients étaient des adultes et des enfants suivis dans la capitale de ce pays.

Certains échantillons étaient déjà disponibles déjà sous forme d'extrait, d'autres n'avaient pas encore subi la phase d'extraction.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau XLII** :

	Age	Sexe	Statut VIH	Diarrhées	ARV	CD4/ μ L	Ziehl	Espèce
Echantillons positifs au Ziehl Neelsen modifié								
Selles déjà extraites par QIAmp® DNA Stool								
N5	43	1	+	chronique	non	59	+	<i>C. hominis</i>
N8	28	1	+	chronique	non	92	+	<i>C. parvum</i>
N11	42	1	+	chronique	non	26	+	<i>C. hominis</i>
N30	34	1	+	aigue	non	22	+	<i>C. hominis</i>
N55	38	1	+	chronique	oui	171	+	<i>C. felis</i>
N'24	30	2	+	nr	nr	37	+	<i>C. hominis</i>
N'48	7	2	+	nr	nr	1	+	<i>C. hominis</i>
Selles extraites par Nucleospin®								
N4	43	1	+	chronique	non	59	+	-
N28	28	2	+	chronique	non	2	+	-
N32	35	1	+	chronique	non	173	+	<i>C. felis</i>
N34	42	1	+	chronique	non	63	+	<i>C. hominis</i>
N48	32	2	+	non	non	16	+	-
N83	48	1	+	chronique	non	101	+	<i>C. hominis</i>
N'5	30	2	+	nr	nr	344	+	-
N'7	38	1	+	nr	nr	178	+	<i>C. parvum</i>
N'32	27	2	+	nr	nr	62	+	<i>C. parvum</i>
N'50	44	1	+	nr	nr	178	+	-
Echantillons négatifs au Ziehl Neelsen modifié, déjà extraits par QIAmp® DNA Stool								
N2	34	1	+	chronique	non	271	-	-
N6	36	2	+	chronique	non	21	-	-
N9	35	1	+	chronique	non	23	-	-
N15	39	1	+	non	non	66	-	-
N43	45	2	+	non	non	10	-	-
N75	28	2	+	chronique	non	19	-	-
N76	36	2	+	aigue	oui 1 mois	21	-	-
N98	22	2	+	non	non	630	-	-
N115	43	1	+	aigue	non	31	-	-
N155	38	1	+	non	non	40	-	-
N'8	30	1	+	nr	nr	36	-	-
N'13	29	2	+	nr	nr	190	-	-

Tableau XLII : Résultats obtenus par PCR F.R.E.T. sur les échantillons de provenance nigérienne obtenus dans le cadre de l'I.N.A.A.R.V.

Parmi ces échantillons, certains avaient déjà été soumis à extraction (kit QIAmp® DNA Stool Mini Kit Qiagen). Les autres ont été extraits par la méthode Nucleospin® Tissue Macherey Nagel à partir d'échantillons de selle brute

nr : non renseigné, - : négatif

Sexe : 1= masculin ; 2= féminin

Il a été retrouvé les deux espèces majoritaires de cryptosporidies chez ces patients : *C. parvum* et *C. hominis*, cette dernière espèce semblant être retrouvée plus fréquemment, la taille de l'échantillon n'étant toutefois pas représentatif. Deux échantillons contenant *C. felis* ont été mis en évidence, confirmant la fréquence de ce parasite en pathologie humaine. Il ne s'agissait pas des patients

les plus immunodéprimés, ce qui conforte la place incontournable de cette espèce chez l'Homme.

Les échantillons trouvés négatifs à la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée ont été confirmés négatifs par la PCR.

III- DISCUSSION ET CONCLUSION

De nombreuses méthodes de biologie moléculaire appliquées au diagnostic de cryptosporidiose ont été publiées. Certaines seulement sont adaptées à la différenciation des espèces de cryptosporidies. Il s'agit essentiellement des méthodes R.F.L.P. basées sur l'analyse des gènes du SSU-rRNA 18S (Awad-el-Kariem, Warhurst *et al.* 1994; Leng, Mosier *et al.* 1996; Lowery, Moore *et al.* 2000; Sturbaum, Reed *et al.* 2001; Coupe, Sarfati *et al.* 2005), des ORF (« Open Reading Frame ») (Carraway, Tzipori *et al.* 1997), de l'HSP70 (Gobet et Toze 2001), de TRAP-C (Spano, Putignani *et al.* 1998) ou de COWP (Spano, Putignani *et al.* 1997). D'autres techniques de biologie moléculaire peuvent également être utilisées dans cet objectif telles que la R.A.P.D. (Peng, Xiao *et al.* 1997; Deng and Cliver 1998; Fayer, Morgan *et al.* 2000), le N.A.S.B.A. (Sturbaum, Reed *et al.* 2001), la SSCP (Gasser, Zhu *et al.* 2001), la Nested PCR (Pedraza-Diaz, Amar *et al.* 2001) ou le séquençage (Morgan, Constantine *et al.* 1997; Pieniasek, Bornay-Llinares *et al.* 1999). Mais rares sont parmi elles les méthodes alliant rapidité, facilité et sensibilité.

La publication de Limor *et al.* est une des seules prétendant réussir l'alliance de tous ces caractères. Elle a donc été jugée très intéressante dans le cadre d'une application clinique au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes.

Malgré les difficultés initiales auxquelles j'ai été confronté pour trouver les conditions optimales de réalisation de cette technique F.R.E.T., elle semble aujourd'hui capable de donner des résultats satisfaisants.

Même si les selles utilisées pour la mise au point de la technique n'ont pas été conservées de façon optimale (durée supérieure à 12 mois, dont une selle conservée depuis plus de trois ans, et en l'absence de dichromate de potassium), il ressort plusieurs points :

La méthode d'extraction semble être optimisée, associant un temps de digestion par la protéinase K allongé et un kit d'extraction adapté aux prélèvements difficiles. Cependant, les méthodes d'extraction ne sont pas du tout standardisées puisque l'offre de techniques d'extraction est pléthorique dans la littérature : chocs thermiques par la chaleur (Deng et Cliver 1998; Sturbaum, Reed *et al.* 2001; Coupe, Sarfati *et al.* 2005), par l'azote liquide (Lowery, Moore *et al.* 2000; Carey, Lee *et al.* 2004), kits d'extraction utilisés partiellement avec modification de l'enzyme de digestion (Di Palma *et al.* 2003) ou association de différents procédés d'extraction (Limor, Lal *et al.* 2002). Il n'a pas été montré dans ce mémoire de supériorité de l'association des cycles de congélation-décongélation avec extraction ultérieure par rapport à l'extraction simple. Elle aurait constitué une contrainte supplémentaire soumise au laboratoire, rendant la technique plus difficile d'application. Cependant, les extraits de selles du Niger préalablement extraits par le kit QIAmp[®] Qiagen ont aussi pu être analysés et ont permis un diagnostic d'espèce. Les difficultés initiales de mise au point de la technique ont certainement été plus dépendante de la qualité de la polymérase que de celle de l'extraction, d'autant que le fragment à amplifier est de longueur importante. On peut donc se poser la question de l'utilité des conditions d'extractions optimisées car rien ne dit que la méthode utilisée ici est effectivement supérieure aux autres. Le seul constat objectif est que la technique F.R.E.T. associée à l'extraction par le kit Nucléospin[®] de Macherey-Nagel semble être plus sensible que les méthodes classiques microscopique et immunochromatographique de diagnostic.

Si la sensibilité semble effectivement supérieure aux méthodes classiques de diagnostic, elle est certainement encore bien inférieure au seuil de détection évoqué dans la publication. En effet, les auteurs établissent ce seuil à cinq oocystes mais dans des conditions idéales d'analyse puisqu'il s'agissait d'oocystes hautement purifiés. L'utilisation de ce type de prélèvement permet effectivement l'utilisation de 55 cycles d'amplification successifs, ce qui, en pratique de routine, est bien entendu impossible, car conduisant à des amplifications non spécifiques. Les conditions décrites dans la publication permettent également de travailler à une température d'hybridation de 50°C et donc d'obtenir une lecture de fluorescence en temps réel, ce qui est apparu peu réalisable en pratique sur des échantillons de selle.

Cette sensibilité peut être remise en cause si l'on considère les prélèvements rendus positifs à la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée et apparaissant négatifs par PCR F.R.E.T. Cependant, l'examen direct par coloration des oocystes est un examen visuel très subjectif, pouvant être source d'erreurs, notamment dans l'observation de milieux complexes représentés par les selles des patients. Au vu de la sensibilité comparative réalisée par dilutions successives des échantillons, la technique de PCR semble tout de même pouvoir donner des résultats plus sensibles et plus objectifs. Les résultats rendus à partir des observations directes étaient vraisemblablement de faux positifs. L'excrétion des oocystes lors d'une infection étant très importante et donc théoriquement aisément reconnaissable par simple coloration, sauf en fin d'évolution de la maladie où l'excrétion devient intermittente, la sensibilité de la technique ne constitue pas forcément le meilleur argument de supériorité de la technique de PCR sur les méthodes classiques de diagnostic et aucun des échantillons négatifs à la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée n'a été retrouvé positif en PCR.

En revanche, cette technique possède tous les éléments pour être dotée d'une très bonne spécificité. Elle bénéficie de trois niveaux de spécificité : spécificité des amorces et donc d'amplification, mais aussi spécificité de détection par utilisation de deux sondes spécifiques et spécificité liée à la température de fusion. Les éléments publiés tendent à appuyer cette spécificité puisqu'aucune amplification non spécifique n'a été constatée avec des parasites de genres voisins tels que *Eimeria* ou *Isospora*.

Par ailleurs, l'absence de détection de courbes de fusion pour les espèces *C. andersoni* et *C. serpentis*, mais avec production de produits d'amplification visualisables sur gel de révélation confirme la spécificité de détection de certaines espèces seulement de cryptosporidies.

Les résultats obtenus sur les échantillons testés sont satisfaisants. Deux espèces majoritaires se détachent de la population hétérogène étudiée : *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis*. Cela corréle totalement les informations retrouvées dans l'étude de la littérature. *Cryptosporidium meleagridis* n'a par contre pas été retrouvé. Il s'agit pourtant en fréquence de la troisième espèce de

cryptosporidies censée être retrouvée en pathologie humaine (Limor, Lal *et al.* 2002). Aucune infection mixte n'a été mise en évidence. Les prélèvements étudiés sont toutefois peut nombreux et vraisemblablement peu représentatifs de l'écologie parasitaire générale. Il a été intéressant de mettre en évidence l'espèce *C. felis* dans trois prélèvements, puisqu'elle a permis de valider la technique pour la détection de cette espèce. L'amplitude de la courbe de fusion obtenue pour cette espèce est régulièrement plus faible que pour *C. hominis* ou *C. parvum* mais semble suffisante pour sa détection, même à taux faibles.

La technique semble montrer quelques limites concernant la détection de toutes les espèces de cryptosporidies pathogènes pour l'Homme. Car si les espèces *C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis* et *C. meleagridis* semblent aisément différenciables selon la température de fusion constatée, il apparaît plus difficile de mettre en évidence un *C. canis* dont la température de fusion est annoncée voisine de celle de *C. parvum*. Ces températures voisines s'expliquent par la présence de deux mésappariements de la sonde Sensor pour ces deux espèces, mais de nature différente. En effet, les températures de fusion mesurées lors de la mise en place de la technique à l'occasion de ce mémoire sont légèrement différentes de celles annoncées dans la publication, notamment 57°C pour *C. parvum* contre 59,30°C dans la publication. Or *C. canis* est censé sortir à une température de fusion voisine de 58°C en théorie. En application clinique, il est probable que la température de fusion constatée pour cette espèce serait de 1 degré inférieur à celle de *C. parvum*, mais cela représente une différence faible. Il faudra être très attentif à toute courbe de fusion s'éloignant de 1°C de celle du témoin utilisé. Il semble en effet nécessaire, à ce stade d'utilisation de cette technique, de passer, parallèlement aux échantillons, des témoins connus d'espèces préalablement définies (ici, *C. hominis*, *C. parvum* et *C. felis*) afin de pouvoir comparer les températures de fusion des échantillons étudiés. En effet, on constate que les températures de fusion peuvent varier d'une série à l'autre, de façon certes faible, mais pouvant induire un doute sur ce type de différenciation. Le passage d'un échantillon témoin permettrait de comparer la température de fusion des échantillons avec un témoin connu et donc de mettre plus facilement en évidence un échantillon déviant, pouvant faire évoquer un *C. canis* par exemple. Il semble également impossible de distinguer *C. muris* ou *C. suis* car ces espèces ne sont pas

mentionnées dans la publication de départ, *C. suis* n'étant pas en 2002 considéré comme une espèce à part entière. Il s'agit cependant de cas exceptionnels, qui ne semblent pas devoir remettre en cause l'utilité de cette PCR F.R.E.T. dans son application épidémiologique.

En effet, les épidémies de cryptosporidioses concernent essentiellement les deux espèces majoritaires, aisément discernables par cette technique. L'apparition de cas groupés présentant la même espèce de cryptosporidie fera d'autant mieux évoquer l'hypothèse épidémique. Quoiqu'il en soit, la recherche du clone responsable ne pourra pas se passer d'études moléculaires plus poussées de type séquençage ou R.F.L.P. mais cette recherche ne relève pas alors de l'urgence et peut être envisagée secondairement.

L'avenir proche du diagnostic biologique des cryptosporidioses chez l'Homme semble appartenir aux techniques immunochromatographiques de lecture rapides, objectives mais présentant, par rapport aux techniques de coloration, l'inconvénient de ne pas mettre en évidence toutes les espèces de cryptosporidies. En effet, l'augmentation des contacts entre l'Homme et les animaux ainsi que l'arrivée de nouveaux animaux de compagnie peut faire craindre l'émergence de nouvelles espèces potentiellement transmissibles à l'Homme.

En terme de spécificité, l'avantage reste aux techniques classiques de coloration.

Le coût élevé en moyens humains et matériels des techniques de PCR représente un frein à son utilisation en routine, mais la PCR F.R.E.T, au delà de sa grande sensibilité, est la seule technique permettant un diagnostic d'espèce rapide et donc un suivi épidémiologique. L'apport épidémiologique semble indiscutable et intéressant en terme de coûts de santé publique dans le cadre de la maîtrise des épidémies.

La fiabilité se dessinera avec la comparaison empirique des données obtenues avec les résultats du centre de référence. Cela permettra de conforter, espérons-le, la confiance accordée à cette technique.

ANNEXES

ANNEXE 1

Table 2 — Named species of *Cryptosporidium*

Parasite species	Host species	Reference
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i> (mouse)	Tyzzler (1907)
<i>C. parvum</i>	<i>Mus musculus</i> (mouse)	Tyzzler (1912)
<i>C. crotali*</i>	<i>Crotalus confluentis</i> (rattlesnake)	Triffitt (1925)
<i>C. vulpis*</i>	<i>Vulpes vulpes</i> (fox)	Wetzel (1938)
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (turkey)	Slavin (1955)
<i>C. tyzzeri</i>	<i>Gallus gallus</i> (chicken)	Levine (1961)
<i>C. lampropeltis*</i>	<i>Lampropeltis calligaster</i> (king snake)	Anderson, Duszynski & Marquardt (1968)
<i>C. ameivae†</i>	<i>Ameiva ameiva</i> (lizard)	Arca de Peraza & Bastardo de San José (1969)
<i>C. ctenosauris*</i>	<i>Ctenosaura similis</i> (lizard)	Duszynski (1969)
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i> (guinea pig)	Vetterling, Jervis, Merrill & Sprinz (1971)
<i>C. agni</i>	<i>Ovis aries</i> (sheep)	Barker & Carbonell (1974)
<i>C. anserinum</i>	<i>Anser anser</i> (goose)	Proctor & Kemp (1974)
<i>C. bovis</i>	<i>Bos taurus</i> (ox)	Barker & Carbonell (1974)
<i>C. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (rabbit)	Inman & Takeuchi (1979)
<i>C. felis</i>	<i>Felis catus</i> (cat)	Iseki (1979)
<i>C. rhesi</i>	<i>Macaca mulatta</i> (rhesus monkey)	Levine (1980)
<i>C. serpentis</i>	Crotalid, colubrid and boid snakes	Levine (1980)
<i>C. garnhami</i>	<i>Homo sapiens</i> (man)	Bird (1981)
<i>C. nasorum</i>	<i>Naso literatus</i> (fish)	Hoover, Hoerr, Carlton, Hinsman & Ferguson (1981)
<i>C. baileyi</i>	<i>Gallus gallus</i> (chicken)	Current, Upton & Haynes (1986)
<i>C. curyi‡</i>	<i>Felis catus</i> (cat)	Ogassawara, Benassi, Larsson & Hagiwara (1986)

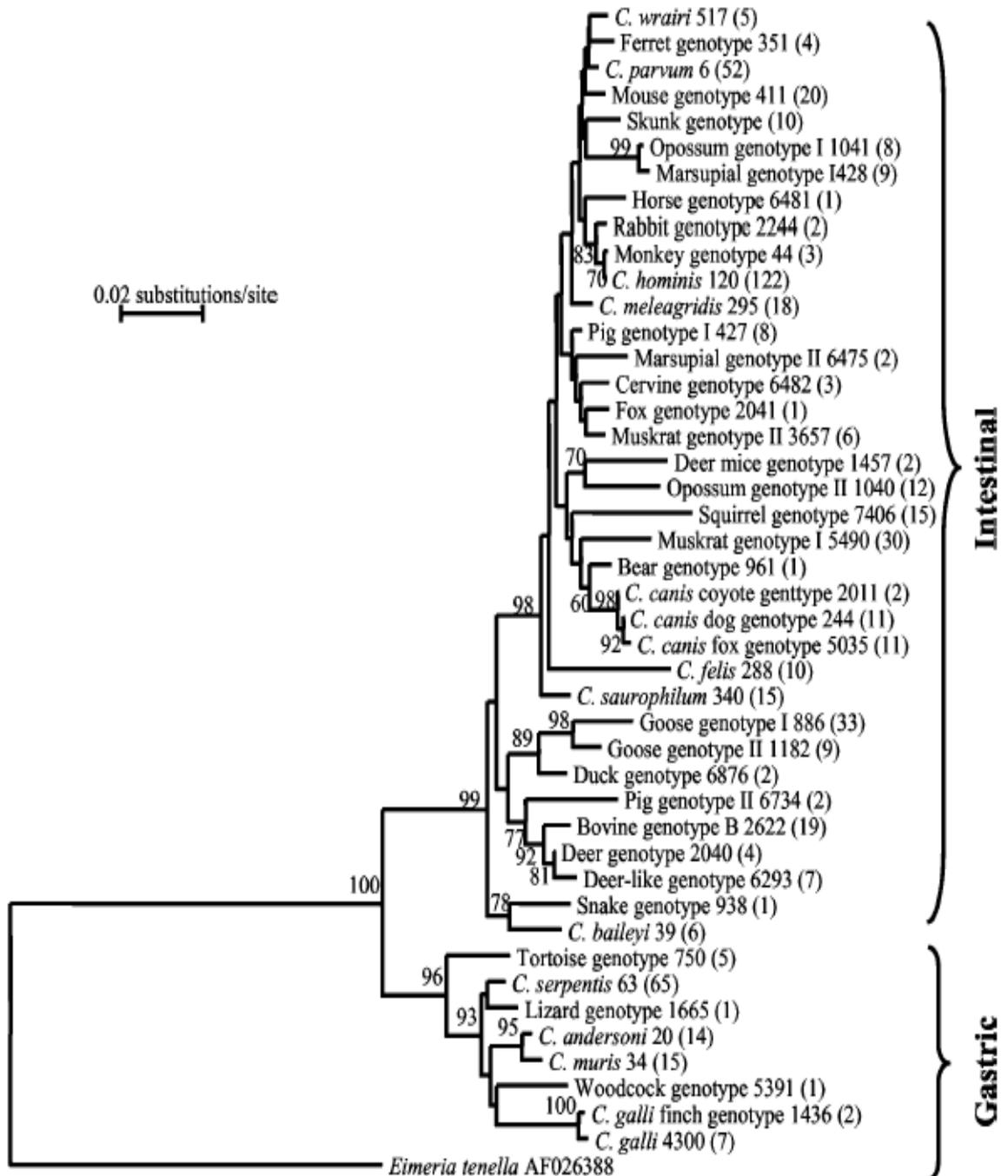
*Erroneous reports (organisms resemble *Sarcocystis* spp. sporocysts).

†*Nomen nudum*.

‡Dubious report (oocysts 5–10 times larger than other *Cryptosporidium* spp.).

Espèces de cryptosporidies nommées en 1995 (O'Donoghue 1995)

ANNEXE 2



Répartition des espèces et des génotypes de *Cryptosporidium* entre espèces à tropisme gastrique et tropisme intestinal, après étude du SSU-rRNA 18S (Xiao, Fayer *et al.* 2004)

ANNEXE 3

C. parvum (and *C. parvum*-like) checklist of 155 mammalian hosts (modified and updated from Fayer et al., 2000a)

Order: Artiodactyla

Addax nasomaculatus (Addax)
Aepyceros melampus (Impala)
Ammotragus lervia (Barbary sheep)
Antidorcas marsupialis (Springbok)
Antilope cervicapra (Blackbuck)
Axis axis (Axis deer)
Bison bison (American bison)
Bison bonasus (European bison)
Bos indicus (Zebu)
B. taurus (Ox)
Boselaphus tragocamelus (Nilgai)
Bubalus bubalis (Water buffalo)
Bubalus depressicornis (Lowland anoa)
Camelus bactrianus (Bactrian camel)
Capra falconeri (Turkomen markhor)
Capra hircus (Goat)
Capreolus capreolus (Roe deer)
Cervus albirostris (Thorold's deer)
Cervus duvauceli (Barasingha deer)
Cervus elaphus (Red deer/elk/wapiti)
Cervus eldi (Eld's deer)
Cervus nippon (Sika deer)
Cervus unicolor (Sambar)
Connochaetes gnou (Wildebeest)
Connochaetes taurinus (Blue-beared gnu)
Dama dama (Fallow deer)
Elaphurus davidianus (Pere David's deer)
Gazella dama (Addra gazelle)
Gazella dorcas (Dorca's gazelle)
Gazella leptoceros (Slender-horned gazelle)
Gazella subgutturosa (Persian gazelle)
Gazella thomsoni (Thomson's gazelle)
Giraffa camelopardalis (Giraffe)
Hexaprotodom liberiensis (Pygmy hippopotamus)
Hippotragus niger (Sable antelope)
Kobus ellipsiprymnus (Ellipsen waterbuck)
Lama glama (Llama)
Lama guanicoe (Guanaco)
Lama pacos (Alpaca)
Muntiacus reevesi (Muntjac deer)
Odocoileus hemionus (Mule deer)
Odocoileus virginianus (White-tailed deer)
Oryx gazella callotys (Fringe-eared oryx)
Oryx gazella dammah (Scimitar-horned oryx)
Ovis aries (Sheep)
Ovis musimon (Mouflon)
Ovis orientalis (Urial)

Sus scrofa (Pig)
Syncerus caffer (African buffalo)
Taurotragus oryx (Eland)
Tayassu tajacu (Collared peccary)
Tragelaphus eurycerus (Bongo)

Order: Carnivora

Acinonyx jubatus (Cheetah)
C. familiaris (Dog)
Canis latrans (Coyote)
Felis catus (Cat)
Helarctos malayanus (Malayan bear)
Martes foina (Beech marten)
Meles meles (Badger)
Mephitis mephitis (Striped skunk)
Mustela putorius (Ferret)
Panthera pardus (Leopard)
Procyon lotor (Raccoon)
Urocyon cinereoargenteus (Grey fox)
Ursus americanus (Black bear)
Ursus arctos (Brown bear)
Ursus (Thalarchos) maritimus (Polar bear)
Vulpes vulpes (Red fox)
Zalophus californianus (California sea lion)

Order: Chiroptera

Eptesicus fuscus (Big brown bat)
Myotis adversus (Large-footed mouse-eared bat)

Order: Insectivora

Ateletrix albiventris (African hedgehog)
Crocidura russula (Greater white-toothed shrew)
Erinaceus europaeus (European hedgehog)
Sorex araneus (Long-tailed shrew)
Sorex minutus (Pygmy shrew)

Order: Lagomorpha

Oryctolagus cuniculus (Rabbit)
Sylvilagus floridanus (Cottontail)

Order: Marsupialia

Antechinus stuartii (Brown antechinus)
Didelphis virginiana (Opossum)
Isodon obesulus (Southern brown bandicoot)
Macropus giganteus (Eastern grey kangaroo)
Macropus rufogriseus (Red neck wallaby)
Macropus rufus (Red kangaroo)
Phascolarctos cinereus (Koala)
Thylogale billardieri (Pademelon)
Trichosurus vulpecula (Brush-tail possum)

Order: Perissodactyla

- Ceratotherium simum* (Southern white rhinoceros)
- Equus caballus* (Horse)
- Equus przewalski* (Miniature horse)
- Equus zebra* (Zebra)
- Rhinoceros unicornis* (Rhinoceros)
- Tapirus terrestris* (Brazilian tapir)

Order: Primates

- Ateles belzebuth* (Marimonda spider monkey)
- Calithrix jacchus* (Common marmoset)
- Cercocebus albigena* (Mangabey)
- Cercocebus torquatus* (White-collared monkey)
- Cercopithecus aethiops* (Velvet monkey)
- Cercopithecus campbelli* (Campbell's mona)
- Cercopithecus talapoin* (Talapoin monkey)
- Erythrocebus patas* (Patas monkey)
- Eulemur macaco* (Black lemur)
- Gorilla gorilla* (Gorilla)
- H. sapiens* (Humans)
- Hylobates syndactylus syndactylus* (Siamang)
- Lemur catta* (Ring-tailed lemur)
- Lemur macacomayottensis* (Brown lemur)
- Lemur variegatus* (Ruffed lemur)
- Macaca fascicularis* (Long-tailed macaque)
- Macaca fuscata* (Japanese macaque)
- Macaca mulatta* (Rhesus monkey)
- Macaca nemestrina* (Cotton-tipped/pigtail macaque)
- Macaca radiata* (Bonnet macaque)
- Macaca thibetana* (Pere David's macaque)
- Mandrillus leucophaeus* (Drill)
- Nycticebus pygmaeus* (Lesser slow loris)
- Papio anubis* (Olive baboon)
- Papio cynocephalus* (Baboon)
- Pithecia pithecia* (White-faced saki)
- Pongo pygmaeus* (Orangutan)
- Saguinus oedipus* (Cotton-topped tamarin)
- Saimiri sciureus* (Squirrel monkey)
- Varecia variegata* (Red-ruffed lemur)

Order: Rodentia

- Apodemus agrarius* (Field mouse)
- Apodemus flavicollis* (Field mouse)
- Apodemus sylvaticus* (Field mouse)
- Castor canadensis* (Beaver)
- Castor fiber* (European beaver)
- C. porcellus* (Guinea pig)
- Chinchilla laniger* (Chinchilla)
- Clethrionomys glareolus* (Red-backed vole)
- Geomys bursarius* (Pocket gopher)

Glaucomys volans (Flying squirrel)
Hystrix indica (Indian porcupine)
Marmota monax (Woodchuck)
Mesocricetus auratus (Golden hamster)
Microtus agrestis (Field vole)
Microtus arvalis (Orkney vole)
M. musculus (House mouse)
Mus spretus (Western Mediterranean mouse)
Myocastor coypus (Coypu)
Ondatra zibethicus (Muskrat)
Rattus norvegicus (Norwegian rat)
Rattus rattus (house rat)
Sciurus carolinensis (Gray squirrel)
Sciurus niger (Fox squirrel)
Sigmodon hispidus (Cotton rat)
Spermophilus beecheyi (California ground squirrel)
Spermophilus tridecemlineatus (13-lined ground squirrel)
Tamias sibiricus (Siberian chipmunk)
Tamias striatus (Chipmunk)

Order: Monotremata

Tacyglossus aculeatus (Echidna)

Order: Proboscidea

Elephas maximus (Indian elephant)

Loxodonta africana (African elephant)

Order: Sirenia

Dugong dugon (Dugong)

Liste des animaux susceptibles d'être parasités par des cryptosporidies (Fayer 2004)

ANNEXE 4

Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in developed nations reported since the early 1990s

Reference	Location	No. of cases	No. of controls	Significant risk factors	Odds ratios (95% CI)
Robertson et al. (2002)	Melbourne	201	795	Eating uncooked carrots Swimming in public pool Children <6 at home with diarrhoea Persons > 5 at home with diarrhoea Animal contact in home Calf contact away from home Drink unboiled water from river, lake or dam	0.6 (0.4-0.9) 2.7 (1.9-3.8) 7.4 (4.0-13.8) 1.8 (1.1-2.9) 0.6 (0.4-0.8) 2.9 (1.5-5.7) 1.5 (0.8-2.7)
Robertson et al. (2002)	Adelaide	134	536	Eating uncooked carrots Swimming in public pool Children <6 at home with diarrhoea Persons > 5 at home with diarrhoea Animal contact in home Calf contact away from home Drink unboiled water from river, lake or dam	0.6 (0.4-0.9) 1.2 (0.8-1.9) 8.6 (4.8-15.6) 3.7 (2.2-6.2) 0.6 (0.4-0.9) 5.1 (1.5-17.3) 3.1 (1.5-6.5)
Roy et al. (2004)	United States	282	490	Contact with persons (>2 to 11 yr old) with diarrhoea Contact with calves or cows International travel Freshwater swimming Eating raw vegetables Chronic medical condition	3.0 (1.5-6.2) 3.5 (1.8-6.8) 7.7 (2.7-22.0) 1.9 (1.0-3.5) 0.5 (0.3-0.7) 2.2 (1.2-4.0)
Hunter et al. (2004)	Wales and NW England	427	427	Travel outside of UK Case contact Touch cattle Toileting child <5 years No. of glasses unboiled water Eat ice cream Eat raw vegetables Eat tomatoes	5.7 (2.9-11.2) 4.6 (2.4-8.7) 3.9 (1.4-10.0) 1.9 (1.1-3.2) 1.1 per glass (1.0-1.3) 0.5 (0.3-0.7) 0.5 (0.3-0.8) 0.6 (0.4-1.0)

Key risk factors from case control study of cryptosporidiosis in Wales and the North West Region of England for identified species (Hunter et al., 2004)

Risk factor	Odds ratios	
	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>
Travel out UK	6.8 (2.6-17.9)	
No. of times in toddler pool	1.3/time (1.0-1.7)	
Sleeping on ground	0.2 (0.1-1.0)	
Nappy changing	4.0 (1.8-8.6)	
Washing fruit and vegetables		
Always	1.0	
Usually	0.4 (0.2-0.8)	
Sometimes	0.9 (0.4-1.8)	
Never	1.6 (0.5-5.1)	
Number of children aged 5-15 in home	0.6/person (0.4-1.0)	
Eat fresh fruit	0.2 (0.1-0.9)	
Touch or handle any farm animals		2.7 (1.1-6.3)
Eat tomatoes		0.3 (0.1-0.7)
Eat raw vegetables		0.2 (0.1-0.6)

Facteurs de risque d'acquisition d'une infection à cryptosporidies selon (Hunter et Thompson 2005)

ANNEXE 5

Année	Lieu	Nombre de cas	Cause suspectée
Cryptosporidioses liées à l'eau de consommation			
1984	Braun Station, TX	2006	Puits contaminé par du fumier
1986	Great Yarmouth, UK	36	Inconnue
1987	Carrollton, GA	12 960	Défaut de traitement de l'eau de rivière
1988	Ayrshire, UK	27	Défaut de traitement d'eau de source
1989	Swindon/ Oxfordshire, UK	516	Défaut de traitement de l'eau de rivière
1990	Loch Lomond	442	Défaut de traitement d'eau de lac
1990-91	Isle of Thanet, UK	47	Défaut de traitement de l'eau de rivière
1991	South London	44	Défaut de traitement de l'eau communale
1991	Berks County, PA	551	Défaut de traitement d'eau de puits
1992	South Devon, UK	?	Eau de consommation contaminée
1992	Nord-ouest du Royaume Uni	42	Id.
1992	Nord-ouest du Royaume Uni	63	Id.
1992	Sud-ouest du royaume Uni	108	Id.
1992	Jackson County, OR	15 000	Défaut de traitement d'eau de rivière
1992	Yorkshire, UK	125	Eau du robinet contaminée
1992	Mersey, UK	47	Id.
1992	Bradford, UK	125	Id.
1992-93	Warrington, UK	47	Id.
1993	Milwaukee, WI	403 000	Défaut de traitement d'eau de lac
1993	Waterloo, Canada	>1000	Eau du robinet contaminée
1993	Las Vegas, NV	103	Inconnue
1993	Wessex, UK	40	Eau du robinet contaminée
1993	Nord du royaume Uni	5	Eau contaminée à l'université
1993	Yorkshire, UK	97	Eau du robinet contaminée
1993	Wessex, UK	27	Id.
1993	Central Maine	>150	Cidre contaminé
1994	Kanagawa, Japon	461	Eau de boisson contaminée
1994	Walla Walla, WA	104	Puits contaminé
1994	SW Thames, Wessex, Oxford, UK	224	Eau du robinet contaminé
1994	Trent, UK	33	Eau du robinet contaminée (?)
1995	Gainesville, FL	77	Eau du robinet contaminée dans un camp
1995	Torbay, Devon, UK	575	Eau de rivière non flocculée
1995	Nord de l'Italie	294	Réserve d'eau potable contaminée
1995	Sud-Ouest du Royaume Uni	575	Eau du robinet contaminée
1996	Eagle Harbor, FL	16	Inconnue
1996	Kelowna, BC	14 500	Eau de lac non filtrée
1996	Cranbrook, BC	2 097	Eau de réservoir non filtrée
1996	Ogose, Japon	>9 000	Eau de source et de nappe non filtrée
1996	Nord de l'Angleterre, UK	126	Eau de boisson contaminée
1996	Yorkshire, UK	20	Id.
1996	Nord-ouest de l'Angleterre, UK	?	Id.
1996	New York	>30	Cidre contaminé
1996	Collingwood, Ontario	182	Eau municipale non filtrée
1997	Shoal Lake, Ontario	100	Eau de lac non filtrée

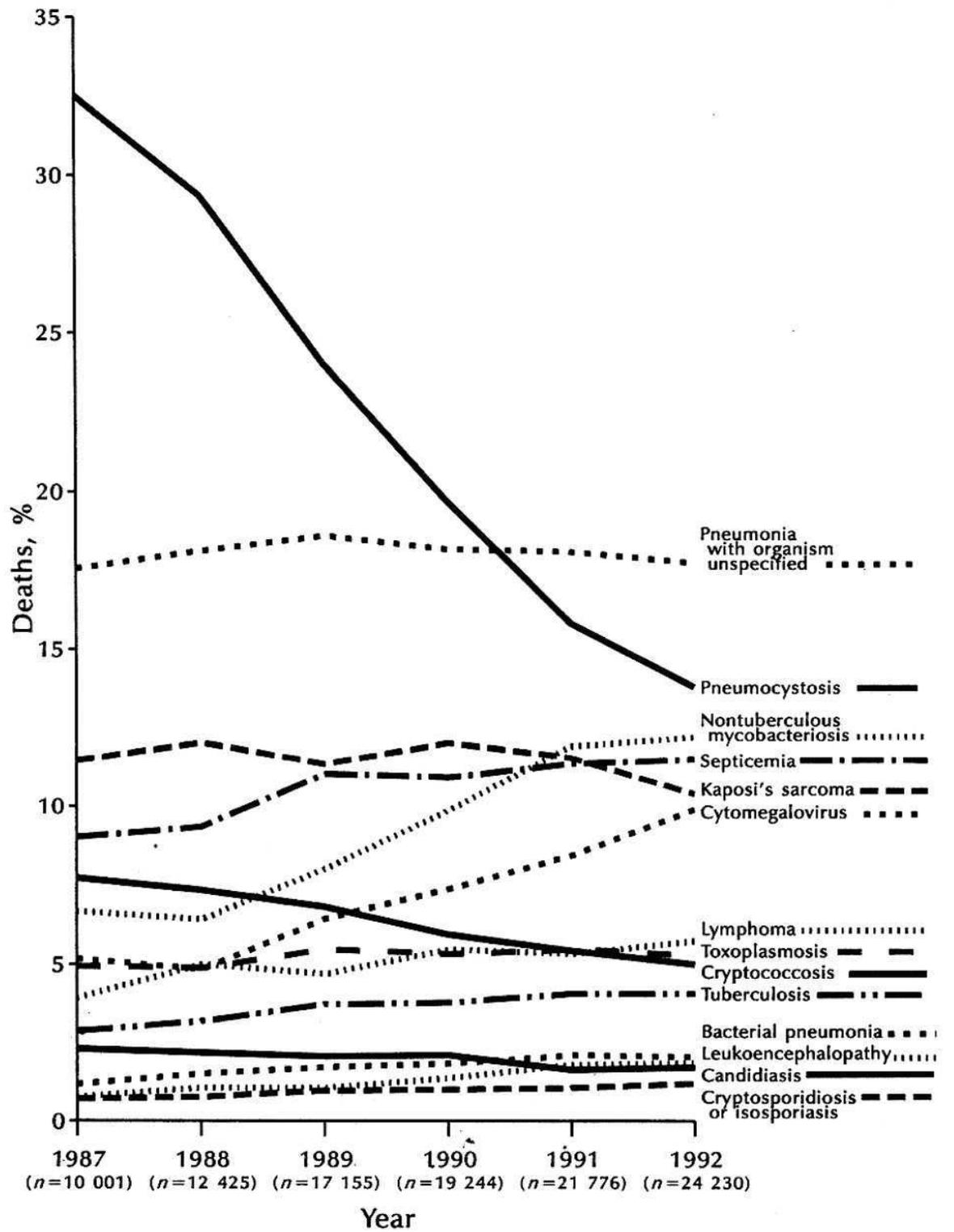
1997	North Thames, UK	345	
1997	Angleterre et Pays de galle, UK	>4 321	Causes multiples
1998	Chilliwack, BC	25-30	?
1998	Brushy Creek, TX	32	Contamination de puits
1999	Hawe's Bay, Nouvelle Zélande	20	?
1999	North Island, Nouvelle-Zélande	?	?
1999	Nord-ouest de l'Angleterre, UK	360	Eau de surface non filtrée
Cryptosporidioses liées à l'eau de loisir			
1986	Albuquerque, NM	56*	Lac
1988	Doncaster, UK	79*	Piscine
1988	County de Los Angeles	44/45	Piscine
1990	British Colombia, Canada	66/23	Piscine
1992	Gloucestershire, UK	13*	Piscine
1992	Idaho	500*	Centre de loisirs aquatiques
1992	Oregon	52*	Piscine à vagues
1993	Wisconsin	51/22	Piscine
1993	Wisconsin	64*	Piscine
1993	Wisconsin	5*	Piscine
1993	Wisconsin	54*	Piscine
1994	Missouri	101/26	Piscine
1994	New Jersey	2 070/46	Lac
1994	Sutherland, Australie	70*	Piscine
1995	Kansas	101/2	Piscine
1995	Georgia	2 470/6	Eau de parc
1995	Nebraska	14*	Eau de parc
1996	Floride	22/16	Piscine
1996	Californie	3 000/29	Eau de parc
1996	Andover, UK	8*	Piscine
1997	Indiana	3*	Lac
1997	Nord-ouest de l'Angleterre et Pays de Galle, UK	27/7	Rivière
1997	Sud-ouest de l'Angleterre et Pays de Galle	9*	Piscine
1998	Minnesota	369/73	Fontaine
1998	Canberra, Australie	210*	3 piscines
1997	Oregon	51/8	Piscine
1998	Queensland, Australie	129*	Piscines
1998	New South Wales, Australie	370*	Piscines
1998	Hutt Valley, Nouvelle Zélande	171*	Piscines

Recensement en 2000 des différentes épidémies de cryptosporidioses liées à l'eau de consommation et de loisir. Le nombre de cas indiqué pour les épidémies liées à l'eau de loisir est indiqué de la façon suivante : nombre de cas estimés sur nombre de cas confirmés (d'après Fayer, Morgan *et al.* 2000). Liste non exhaustive.

*Nombre de cas estimés ou recensés, sans indication

Id.= idem

ANNEXE 6



Causes de mortalité des patients V.I.H. entre 1987 et 1992 aux USA (Selik, Chu *et al.* 1995)

ANNEXE 7

Protéines	Rôles
Gp900	Adhérence et invasion des sporozoïtes Sécrétée par les sporozoïtes en mouvement
P23	Motilité des sporozoïtes Sécrétée par les sporozoïtes en mouvement
CPS-500	Sécrétée par les sporozoïtes en mouvement Adhésion
CSL	Circumsporozoïte like precipitate Adhésion Récepteur cellulaire de 85 kDa
CP47	Attachement cellulaire Protéine de membrane Récepteur cellulaire de 57 kDa
Cpa 135	Motilité Abondamment exprimée dans les premières phases de l'excystation
TRAP-C1, TRAP-C2	Adhésion Motilité
Gal/GalNAc lectine	Adhésion
sPLA₂	Facteur de virulence avec activité hémolytique? Invasion
P23/27	Adhésion Motilité
Gp15/Cp17	Adhésion Epitopes communs avec gp900
Gp60/40/15	Gp15 et gp 40 sont issues du clivage de gp60. Elles sont sécrétées par le sporozoïte en mouvement Rôle dans l'adhésion.
Hémolysine H4	Provoque la lyse membranaire Homologie avec l'hémolysine d' <i>E. coli</i> O157 :H7
Cystéine protéase	Rôle inconnu En surface des sporozoïtes
Sérine protéase	Rôle dans l'excystation
HSP70	Protéine de choc thermique Grand polymorphisme. Les expressions quantitatives et qualitatives de cette protéine sont impliquées dans les variations de virulence chez <i>Toxoplasma</i> .
HSP90	Protéine de choc thermique

Protéines impliquées dans la pathogenèse des *Cryptosporidium* (d'après Okhuysen et Chappell 2002)

ANNEXE 8

Traditional Assays for *Cryptosporidium*

Name	Specificity	Sensitivity	Advantages	Disadvantages
*Modified acid-fast stain.	Not specific for <i>Cryptosporidium</i> .	Not as sensitive as immunodiagnostic methods.	Inexpensive. Allows detection of other parasites such as <i>Isoospora</i> or <i>Cyclospora</i> that would be missed by specific immunodiagnostic kits.	May be less sensitive than some specific immunodiagnostic kits.
Auramine-rhodamine stain.	Not specific for <i>Cryptosporidium</i> .	Not as sensitive as immunodiagnostic methods.	Inexpensive. Rapid screening possible at lower power magnification.	May be less sensitive than some specific immunodiagnostic kits. Fluorescent microscope required. Should be confirmed by a more specific method such as EIA or IFA.
Observation of direct wet mount with or without iodine.	Not specific for <i>Cryptosporidium</i> .	Not as sensitive as immunodiagnostic methods.	Does not require concentration. Inexpensive. Can provide rapid detection of oocysts without concentration, especially in heavy infections or in early outbreak situations.	Should be confirmed by a modified acid-fast stain or more specific methods such as EIA or IFA. Concentration with Formalin ethyl acetate is recommended. Direct wet mount is not sufficient to detect oocysts in light infections usually seen in follow-up, test-of-cure, and examinations of stool from patients shedding oocysts.

* *The modified acid-fast stain, as used for Nocardia, does not use acid alcohol but uses 1 to 3% sulfuric acid as the decolorizer.*

Use of trade names and commercial sources is for identification only and does not imply endorsement by the Public Health Service, the U.S. Department of Health and Human Services, the Centers for Disease Control and Prevention, or any of the member agencies of the Working Group on Waterborne Cryptosporidiosis.

ANNEXE 9

Technique	Apparence des oocystes	Coloration des levures
Coloration directe		
Giemsa	bleu	Bleu
Gram	rouge	Violet
Kohn	Vert	Gris
Bleu de méthylène	Bleu clair	Bleu foncé
Violet d'aniline-carbolméthyle	Bleu	Incolore
Safranine + contre coloration	Orange	Contre-coloré
Méthode rapides acides		
Kinyoun	Rouge	Contre-coloré
Ziehl-Neelsen	Rouge	Contre-coloré
DMSO- carbole fuchsine	Rouge	Contre-coloré
Colorations par fluorochrome		
Auramine-rhodamine	Orange	Incolore
Auramine-carbol fuchsine	Orange	Incolore
Acridine orange	Orange/ vert	Orange
Diamidino-phenylindole	Bleu	Incolore
Mepacrine	Orange	Incolore
Iodide de propidium	Rouge	Incolore
Coloration négative		
Carbol-fuchsine	Incolore	Bleu
Iodine	Incolore	Marron
Vert	Incolore	Vert
Merbromine	Incolore	Orange
Méthanamine argentique	Incolore	Noir
Nigrosine	Incolore	Incolore
Schiff-acide périodique	Incolore	Rouge
Acétate d'uranyle	Marron clair	Noir
Acide phosphotungstique	Marron clair	Noir

Liste des colorations disponibles pour le diagnostic de cryptosporidiose dans les selles d'après O'Donoghue 1995

ANNEXE 10

Substances ayant montré une efficacité vis à vis des cryptosporidies
Amélioration clinique ou apparente résolution de l'infection
Azidothymidine Azithromycine Colostrum bovin Facteur bovin Cotrimoxazole Diclazuril Diloxamide furoate Diphénoxylate Erythromycine Furazolidone Immunoglobulines humaines Colostrum bovin hyperimmun Interleukine 2 Letrazuril Sulfate de morphine Octréotide Paromomycine Procaïne Quinine/clindamycine Somatostatine Spiramycine
Réduction de la sévérité de l'infection <i>in vitro</i>
Alborixine Amprolium Arprinocide Azithromycine Colostrum bovin Clarithromycine Cyclosporine A Déhydroépiandrosterone Dinitolmide Erythromycine Lactate d'halofuginone Colostrum bovin hyperimmun Lasalocide Maduramycine Mepacrine Metronidazole Anticorps monoclonaux Oléandomycine Paromomycine Pentamidine Salinomycine Sinefungine Sulfamethoxine
Réduction de la viabilité et/ou de l'infectiosité des sporozoïtes <i>in vitro</i>
Colchicine Hecate-1 Colostrum bovin hyperimmun Sérum hyper immun bovin Sérum hyper immun ovin Anticorps monoclonaux Sérum ovin Paromomycine Shiva-10 Vinblastine

Substances ayant démontré une certaine efficacité sur les cryptosporidies (d'après O'Donoghue 1995)

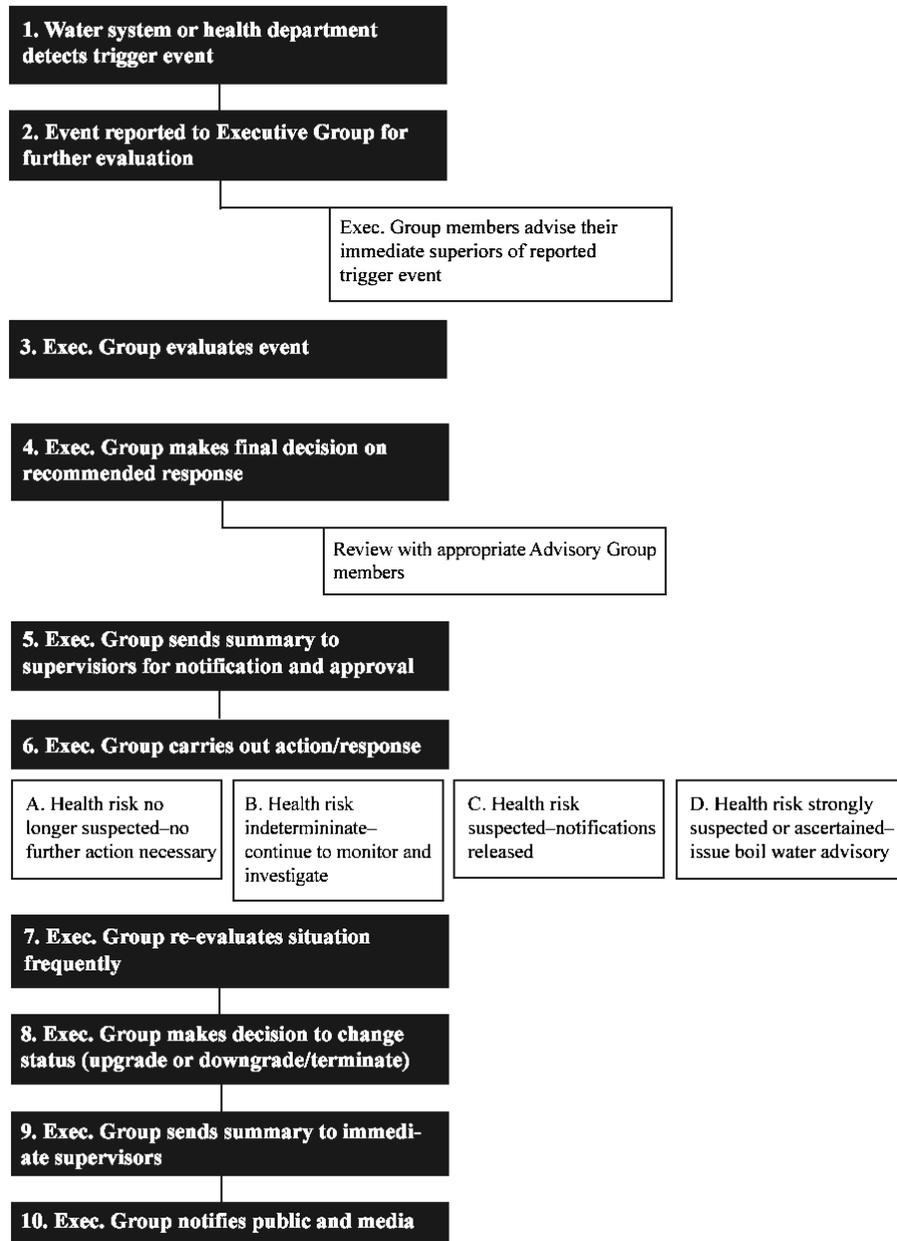
ANNEXE 11

Agent désinfectant	Méthode efficace
Ammoniaque	5% pendant 120 minutes ou 50% pendant 30 minutes
Dioxyde de chlore	0.4 p.p.m. pendant 15 minutes ou 1.3 p.p.m. pendant 60 minutes
Dessiccation	4 heures
Formol salin	10% pendant 120 minutes
Congélation	- 70°C
Peroxyde d'hydrogène	3% (10 volumes) pendant 30 minutes
Autoclavage	45-55°C pendant 15-20 minutes
Ozone	1.11 p.p.m. pendant 6 minutes ou 1 p.p.m. pendant 5 minutes

Liste des produits recensés comme efficaces contre les *Cryptosporidium* dans la désinfection (d'après O'Donoghue 1995)

ANNEXE 12

Flow Chart for Action/Response Plan



Plan d'action proposé par le CDC pour la gestion des épidémies à cryptosporidies (Centers for Disease Control and Prevention 1997)

ANNEXE 13

Suggestions for Assessments
Establish a baseline of the number of stool specimens submitted per day or week: for example, the daily or weekly average for the previous month or year, or a rolling 3-month weekly average, or the prior week's total. Compare the number of current cases with the chosen baseline threshold.
When possible, have your LIS activate a "flag" when baseline thresholds are exceeded.
If resources do not allow for routine quantitative monitoring: call your public health authority when a noticeable increase in stools with no apparent explanation occurs, especially diarrheal stools. Several such calls from laboratories could suggest a meaningful pattern.
If a laboratory is unable to test or confirm a positive <i>Cryptosporidium</i> finding, then that laboratory should have plans in place with another facility such as a state or local public health or reference laboratory to do such testing.
When a noticeable increase of enteric pathogen-negative diarrheal specimens occurs, your clinical microbiologists should suggest to physicians that testing for <i>Cryptosporidium</i> and other enteric pathogens may be appropriate.
Notify public health authorities when any increase in findings of <i>Cryptosporidium</i> or other enteric pathogens are confirmed, following the guidelines of your public health response plan (see Chapter 1).

Mesures de suivi des infections à cryptosporidies pour les laboratoires d'analyses médicales aux USA, d'après le CDC (Centers for Disease Control and Prevention 1997)

ANNEXE 15

Protocol-at-a-glance (Rev. 06) Genomic DNA Purification from Tissue



Mini

NucleoSpin® Tissue

1	Prepare sample		Cut 25 mg tissue into small pieces
2	Pre-Lysis		180 µl T1 25 µl proteinase K 56°C 1-3 h
3	Lysis		200 µl B3 70°C 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 µl ethanol
5	Bind DNA	 	load all 1 min 11,000 x g
6	Wash silica membrane	 	1 st wash 500 µl BW 2 nd wash 600 µl B5 1 st and 2 nd wash 1 min 11,000 x g
7	Dry silica membrane	 	1 min 11,000 x g
8	Elute highly pure DNA	 	100 µl BE (70°C) RT 1 min 1 min 11,000 x g

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG • Neumann-Neander Str. 6-8 • D-52355 Düren • Germany
Tel.: +49 (0) 24 21 969 270 • Fax: +49 (0) 24 21 969 279 • e-mail: tech-bio@mn-net.com

Abrégé de la notice du kit d'extraction Nucleospin® de Macherey Nagel

ANNEXE 16

Laboratoire de parasitologie Hôtel-Dieu CHU NANTES	MODE OPERATOIRE PCR F.R.E.T. CRYPTOSPORIDIES
---	---

Objet :

Amplification et révélation du gène du SSU-rRNA 18S des cryptosporidies par PCR à partir de selles humaines et identification de l'espèce par courbe de fusion.

Documents de référence :

Manuel des 222 exigences du GBEA (JO du 11 décembre 1999)

Domaine d'application

Techniciens de laboratoire ayant une formation en biologie moléculaire et internes formés.

Echantillons

Il s'agit de prélèvements de selle, fraîches de préférence, ou conservées à +4°C dans une solution de bichromate de potassium à 2,5% ou en l'état.

Extraction

L'extraction est effectuée par le kit Nucleospin® de Macherey-Nagel sans extraction préalable par l'azote liquide. Le temps de digestion par la protéinase K est porté à 12h. Les extraits sont conservés à -20°C.

Préparation du Mix

La préparation du milieu réactionnel s'effectue en salle blanche équipé de tout le matériel nécessaire.

Matériel :

Prémix Ex-TaKaRa® conservé à +4°C
Amorces 1 et 2
Sondes 1 et 2
Contrôle interne : IPC (APPLERA France)
Eau stérile
Pipettes
Cônes à filtre

Mix :

	Concentration initiale	Concentration finale	Volumes en μL
			1 tube
TAMPON 2X Ex-TaKaRa®	2 X	1X	10
Amorce 1	5 μM	0,3 μM	1,2
Amorce 2	5 μM	0,3 μM	1,2
Sonde 1	5 μM	0,1 μM	0,4
Sonde 2	5 μM	0,1 μM	0,4
IPC Mix (amorces et sonde)	10 X	0,5 X	1
IPC 50X Applied	50 X	0,25 X	0,1
Eau stérile			0,7
DNA extrait			5
Volume total			20

Mode opératoire

Prévoir autant de tubes que d'extraits.

Prévoir en plus un contrôle négatif (eau stérile), des contrôles positifs (patients connus à *C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis*) et le témoin d'extraction.

Préparer le mix en fonction du nombre de tubes à analyser.

Répartir 15 μL par tube. Un lit de glace n'est pas indispensable, la polymérase utilisée étant une « Hot-Start ».

Les 5 μL d'extraits d'ADN et des témoins négatifs et positifs sont ajoutés en pièce de coprologie avec une pipette dédiée à cet usage.

Les tubes sont placés sur le Rotor Gene (cf MO-419 p :5)

Choisir le bon programme de températures sur 45 cycles :

Etapas		T (°C)	Temps
Dénaturation		94°C	10 minutes
45 cycles	Dénaturation	94°C	20s
	Hybridation	50°C	30s
	Elongation	72°C	30s
Dénaturation		95°C	15 s
Hybridation		45°C	30s
Ascension thermique		45-70°C	

L'acquisition est effectuée selon le mode Cy5 excité par FAM comprenant une excitation à 470 nm et une acquisition à 660 nm. Ne pas oublier l'acquisition du témoin interne.

La lecture des résultats ne s'effectue pas en temps réel mais en analyse de courbes de fusion (« Analysis » puis « melt »).

Les températures de fusion sont relevées après avoir fixé le seuil à 0,20.

Les températures relevées sont comparées aux températures des témoins positifs, les températures de fusion pour des espèces identiques de cryptosporidies doivent être très proches les unes des autres, sinon, envisager d'autres espèces de cryptosporidies, à séquencer pour confirmation.

BIBLIOGRAPHIE

- (1998). "Outbreak of cryptosporidiosis associated with a water sprinkler fountain--Minnesota, 1997." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **47**(40): 856-60.
- Awad-el-Kariem, F. M., H. A. Robinson, *et al.* (1995). "Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing." Parasitology **110** (Pt 2): 129-32.
- Awad-el-Kariem, F. M., D. C. Warhurst, *et al.* (1994). "Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction." Parasitology **109** (Pt 1): 19-22.
- Bogard, M., J. Lamoril *et al.* (2005). "Principes de biologie moléculaire en biologie clinique." Campus Reference, Elsevier.
- Bornay-Llinares, F. J., A. J. da Silva, *et al.* (1999). "Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods." Appl Environ Microbiol **65**(4): 1455-8.
- Caccio, S. M., R. C. Thompson, *et al.* (2005). "Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology." Trends Parasitol **21**(9): 430-7.
- Carey, C. M., H. Lee, *et al.* (2004). "Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst." Water Res **38**(4): 818-62.
- Carraway, M., S. Tzipori, *et al.* (1997). "A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts." Infect Immun **65**(9): 3958-60.
- Chacin-Bonilla, L. (2007). "[*Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy]." Invest Clin **48**(1): 1-4.
- Chappell, C. L., P. C. Okhuysen, *et al.* (2006). "*Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults." Am J Trop Med Hyg **75**(5): 851-7.

- Checkley, W., R. H. Gilman, *et al.* (1997). "Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children." Am J Epidemiol **145**(2): 156-63.
- Chen, X. M. and N. F. LaRusso (2000). "Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells." Gastroenterology **118**(2): 368-79.
- Chen, X. M., S. A. Levine, *et al.* (2001). "Cryptosporidium parvum activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis." Gastroenterology **120**(7): 1774-83.
- Colford, J. M., Jr., I. B. Tager, *et al.* (1996). "Cryptosporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. Factors related to symptomatic infection and survival." Am J Epidemiol **144**(9): 807-16.
- Coupe, S., C. Sarfati, *et al.* (2005). "Detection of cryptosporidium and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism." J Clin Microbiol **43**(3): 1017-23.
- Deng, M., M. S. Rutherford, *et al.* (2004). "Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*." Adv Drug Deliv Rev **56**(6): 869-84.
- Deng, M. Q. and D. O. Cliver (1998). "Differentiation of *Cryptosporidium parvum* isolates by a simplified randomly amplified polymorphic DNA technique." Appl Environ Microbiol **64**(5): 1954-7.
- Dillingham, R. A., A. A. Lima, *et al.* (2002). "Cryptosporidiosis: epidemiology and impact." Microbes Infect **4**(10): 1059-66.
- Di Palma, M., S. Carbonel *et al.* (2003). "Epidémie de gastro-entérite à *Cryptosporidium*." *INVS*.
- DuPont, H. L., C. L. Chappell, *et al.* (1995). "The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers." N Engl J Med **332**(13): 855-9.

- Elliott, D. A. et D. P. Clark (2000). "Cryptosporidium parvum induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface." Infect Immun **68**(4): 2315-22.
- Espen , A. (2006). "Prévalence et études génotypiques des microsporidies dans trois zones géographiques distinctes (Vietnam, Niger et France"
- Espy, M. J., J. R. Uhl, *et al.* (2006). "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing." Clin Microbiol Rev **19**(1): 165-256.
- Faraci, M., B. Cappelli, *et al.* (2007). "Nitazoxanide or CD3+/CD4+ lymphocytes for recovery from severe Cryptosporidium infection after allogeneic bone marrow transplant?" Pediatr Transplant **11**(1): 113-6.
- Fayer, R. (2004). "Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite." Vet Parasitol **126**(1-2): 37-56.
- Fayer, R., U. Morgan, *et al.* (2000). "Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification." Int J Parasitol **30**(12-13): 1305-22.
- Feltus, D. C., C. W. Giddings, *et al.* (2006). "Evidence supporting zoonotic transmission of Cryptosporidium spp. in Wisconsin." J Clin Microbiol **44**(12): 4303-8.
- Gasser, R. B., X. Zhu, *et al.* (2001). "Genotyping Cryptosporidium parvum by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions." Electrophoresis **22**(3): 433-7.
- Gatei, W., R. W. Ashford, *et al.* (2002). "Cryptosporidium muris infection in an HIV-infected adult, Kenya." Emerg Infect Dis **8**(2): 204-6.
- Gatei, W., J. Greensill, *et al.* (2003). "Molecular analysis of the 18S rRNA gene of Cryptosporidium parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam." J Clin Microbiol **41**(4): 1458-62.

- Gay-Andrieu, F., E. Adehossi (2007). "Prevalence of cryptosporidiosis in Niamey (niger) pediatric hospital patients" Bull Soc Pathol Exot **100**(3):193-6.
- Gobet, P. et S. Toze (2001). "Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene." FEMS Microbiol Lett **200**(1): 37-41.
- Graczyk, T. K., R. Fayer, *et al.* (2000). "Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies." Am J Trop Med Hyg **63**(3-4): 178-83.
- Guyot, K., A. Follet-Dumoulin, *et al.* (2001). "Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France." J Clin Microbiol **39**(10): 3472-80.
- Hashim, A., G. Mulcahy, *et al.* (2006). "Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells." Infect Immun **74**(1): 99-107.
- Hashmey, R., N. H. Smith, *et al.* (1997). "Cryptosporidiosis in Houston, Texas. A report of 95 cases." Medicine (Baltimore) **76**(2): 118-39.
- Hernandez, J., A. Lackner, *et al.* (2007). "Substance P is responsible for physiological alterations such as increased chloride ion secretion and glucose malabsorption in cryptosporidiosis." Infect Immun **75**(3): 1137-43.
- Hijjawi, N. S., B. P. Meloni, *et al.* (2001). "Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture." Int J Parasitol **31**(10): 1048-55.
- Hu, W., S. Tong, *et al.* (2007). "Weather Variability and the Incidence of Cryptosporidiosis: Comparison of Time Series Poisson Regression and SARIMA Models." Ann Epidemiol **17**(9): 679-688.

- Huang, D. B., C. Chappell, *et al.* (2004). "Cryptosporidiosis in children." Semin Pediatr Infect Dis **15**(4): 253-9.
- Hunter, P. R. et G. Nichols (2002). "Epidemiology and clinical features of Cryptosporidium infection in immunocompromised patients." Clin Microbiol Rev **15**(1): 145-54.
- Hunter, P. R. et R. C. Thompson (2005). "The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium." Int J Parasitol **35**(11-12): 1181-90.
- Jongwutiwes, S., R. Tiangtip, *et al.* (2002). "Simple method for long-term copro-preservation of Cryptosporidium oocysts for morphometric and molecular analysis." Trop Med Int Health **7**(3): 257-64.
- Karanis, P., C. Kourenti, *et al.* (2007). "Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt." J Water Health **5**(1): 1-38.
- Kocoshis, S. A., M. L. Cibull, *et al.* (1984). "Intestinal and pulmonary cryptosporidiosis in an infant with severe combined immune deficiency." J Pediatr Gastroenterol Nutr **3**(1): 149-57.
- Kosek, M., C. Alcantara, *et al.* (2001). "Cryptosporidiosis: an update." Lancet Infect Dis **1**(4): 262-9.
- Laurent, F., M. F. Kagnoff, *et al.* (1998). "Human intestinal epithelial cells respond to Cryptosporidium parvum infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production." Infect Immun **66**(4): 1787-90.
- LeChevallier, M. W., W. D. Norton, *et al.* (1991). "Giardia and Cryptosporidium spp. in filtered drinking water supplies." Appl Environ Microbiol **57**(9): 2617-21.
- LeChevallier, M. W., W. D. Norton, *et al.* (1991). "Occurrence of Giardia and Cryptosporidium spp. in surface water supplies." Appl Environ Microbiol **57**(9): 2610-6.

- Leng, X., D. A. Mosier, *et al.* (1996). "Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene." *Vet Parasitol* **62**(1-2): 1-7.
- Limor, J. R., A. A. Lal, *et al.* (2002). "Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR." *J Clin Microbiol* **40**(7): 2335-8.
- Lowery, C. J., J. E. Moore, *et al.* (2000). "Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction." *J Med Microbiol* **49**(9): 779-85.
- Maigné, G., V. Martinez *et al.* (2007). "Cryptosporidial diarrhoea in two HIV-infected patients: potential efficacy of rifampicin for successful treatment" *AIDS* **21**(9):1221-2.
- Manabe, Y. C., D. P. Clark, *et al.* (1998). "Cryptosporidiosis in patients with AIDS: correlates of disease and survival." *Clin Infect Dis* **27**(3): 536-42.
- McLauchlin, J., C. Amar, *et al.* (2000). "Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals." *J Clin Microbiol* **38**(11): 3984-90.
- Mendez-Hermida, F., H. Gomez-Couso, *et al.* (2007). "Possible involvement of *Artemia* as live diet in the transmission of cryptosporidiosis in cultured fish." *Parasitol Res* **101**(3): 823-7.
- Mercado, R., G. A. Buck, *et al.* (2007). "*Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract." *Emerg Infect Dis* **13**(3): 462-4.
- Molbak, K., N. Hojlyng, *et al.* (1993). "Cryptosporidiosis in infancy and childhood mortality in Guinea Bissau, west Africa." *Bmj* **307**(6901): 417-20.
- Morgan, U., R. Weber, *et al.* (2000). "Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States." *J Clin Microbiol* **38**(3): 1180-3.

- Morgan, U. M., C. C. Constantine, *et al.* (1997). "Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis." J Parasitol **83**(5): 825-30.
- Morgan, U. M., L. Xiao, *et al.* (1999). "Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus." Int J Parasitol **29**(11): 1733-51.
- Nagamani, K., P. R. Pavuluri, *et al.* (2007). "Molecular characterisation of *Cryptosporidium*: an emerging parasite." Indian J Med Microbiol **25**(2): 133-6.
- Navin, T. R., R. Weber, *et al.* (1999). "Declining CD4+ T-lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: results of a 3-year longitudinal study." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **20**(2): 154-9.
- Neira-Otero, P., N. Munoz-Saldias, *et al.* (2005). "Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile." Parasitol Res **97**(1): 63-7.
- Newman, R. D., C. L. Sears, *et al.* (1999). "Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil." J Infect Dis **180**(1): 167-75.
- Nime, F. A., J. D. Burek, *et al.* (1976). "Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*." Gastroenterology **70**(4): 592-8.
- O'Brien, C. N. and M. C. Jenkins (2007). "A rapid method for producing highly purified *Cryptosporidium parvum* oocysts." J Parasitol **93**(2): 434-6.
- O'Donoghue, P. J. (1995). "*Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals." Int J Parasitol **25**(2): 139-95.
- Okhuysen, P. C. et C. L. Chappell (2002). "*Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet?" Int J Parasitol **32**(5): 517-25.

- Ong, C. S., D. L. Eisler, *et al.* (2002). "Novel cryptosporidium genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype." Emerg Infect Dis **8**(3): 263-8.
- Pavlašek, I. et U. Ryan (2007). "The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat." Vet Parasitol **144**(3-4): 349-52.
- Pedraza-Díaz, S., C. Amar, *et al.* (2001). "Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene." Emerg Infect Dis **7**(1): 49-56.
- Pieniazek, N. J., F. J. Bornay-Llinares, *et al.* (1999). "New cryptosporidium genotypes in HIV-infected persons." Emerg Infect Dis **5**(3): 444-9.
- Quiroz, E. S., C. Bern, *et al.* (2000). "An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler." J Infect Dis **181**(2): 695-700.
- Raccurt, C. P. (2007). "[Worldwide human zoonotic cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium felis*]." Parasite **14**(1): 15-20.
- Ramírez, N. E., L. A. Ward, *et al.* (2004). "A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals." Microbes Infect **6**(8): 773-85.
- Revue du praticien (2007). 2(57): 175-82.
- Riggs, M. W. (2002). "Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response." Microbes Infect **4**(10): 1067-80.
- Selik, R. M., S. Y. Chu, *et al.* (1995). "Trends in infectious diseases and cancers among persons dying of HIV infection in the United States from 1987 to 1992." Ann Intern Med **123**(12): 933-6.
- Smith, H. V., S. M. Caccio, *et al.* (2006). "Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans." Trends Parasitol **22**(4): 160-7.

- Smith, H. V., R. A. Nichols, *et al.* (2005). "Cryptosporidium excystation and invasion: getting to the guts of the matter." Trends Parasitol **21**(3): 133-42.
- Spano, F., L. Putignani, *et al.* (1998). "Cryptosporidium parvum: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of Cryptosporidium-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin." Exp Parasitol **90**(2): 195-8.
- Spano, F., L. Putignani, *et al.* (1997). "PCR-RFLP analysis of the Cryptosporidium oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between C. wrairi and C. parvum, and between C. parvum isolates of human and animal origin." FEMS Microbiol Lett **150**(2): 209-17.
- Stratagen (2007). "Introduction to quantitative PCR" : 65p.
- Sturbaum, G. D., C. Reed, *et al.* (2001). "Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single Cryptosporidium parvum oocysts." Appl Environ Microbiol **67**(6): 2665-8.
- Tanriverdi, S. et G. Widmer (2006). "Differential evolution of repetitive sequences in Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis." Infect Genet Evol **6**(2): 113-22.
- Tiangtip, R. et S. Jongwutiwes (2002). "Molecular analysis of Cryptosporidium species isolated from HIV-infected patients in Thailand." Trop Med Int Health **7**(4): 357-64.
- Vakil, N. B., S. M. Schwartz, *et al.* (1996). "Biliary cryptosporidiosis in HIV-infected people after the waterborne outbreak of cryptosporidiosis in Milwaukee." N Engl J Med **334**(1): 19-23.
- Xiao, L., C. Bern, *et al.* (2001). "Identification of 5 types of Cryptosporidium parasites in children in Lima, Peru." J Infect Dis **183**(3): 492-7.
- Xiao, L., R. Fayer, *et al.* (2004). "Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health." Clin Microbiol Rev **17**(1): 72-97.

Xiao, L., R. B. Lal, *et al.* (1999). "Effect of immune activation induced by *Cryptosporidium parvum* whole antigen on in vitro human immunodeficiency virus type 1 infection." J Infect Dis **180**(2): 559-63.

Xiao, L., U. M. Morgan, *et al.* (2000). "Cryptosporidium systematics and implications for public health." Parasitol Today **16**(7): 287-92.

MOURIER Vincent

TITRE DU MEMOIRE : Apport d'une PCR en temps réel par technique F.R.E.T. dans le diagnostic et l'épidémiologie des cryptosporidioses humaines

RESUME :

La cryptosporidiose est une parasitose cosmopolite liée à un protozoaire du genre *Cryptosporidium*. Elle est responsable de troubles digestifs pouvant être particulièrement graves pour certaines populations. Les deux groupes humains les plus à risque sont les individus immunodéprimés et les jeunes enfants mais les infections concernent également les immunocompétents. Deux espèces sont essentiellement impliquées en pathologie humaine : *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium parvum* qui peuvent être responsables de cas sporadiques ou de véritables épidémies. La contamination humaine s'effectue par ingestion d'oocystes infectieux, terme ultime du cycle de réplication du parasite au sein des entérocytes. Les transmissions sont liées pour la plupart à l'absorption d'eau contaminée par des oocystes d'origine humaine ou animale. D'autres espèces moins adaptées à l'Homme peuvent être également retrouvées telles que *C. felis* ou *C. meleagridis*.

Le diagnostic biologique repose essentiellement sur les techniques de coloration et les techniques immunochromatographiques de détection des oocystes dans les selles des patients.

Ce mémoire envisage l'intérêt et la mise au point d'une technique de PCR de type F.R.E.T. permettant la détection, l'identification des espèces de *Cryptosporidium* et donc un suivi épidémiologique rapide et objectif.

MOTS CLES : CRYPTOSPORIDIOSE, CRYPTOSPORIDIES, PCR, FRET, EPIDEMIOLOGIE

JURY :

PRESIDENT : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie, Faculté de Pharmacie de Nantes
ASSESEURS : M. François RAFFI, Professeur d'Infectiologie, Faculté de Médecine de Nantes
M. Michel MIEGEVILLE, MCU-PH de Parasitologie
M. Olivier GROSSI, Chef de Clinique d'Infectiologie, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 18 rue Lamoricière, 44 100 Nantes