



HAL
open science

Détection et caractérisation moléculaire de Cryptosporidium sp. et de Giardia sp. chez les hérissons européens (*Erinaceus europaeus*) arrivés au Chuv-FS de l'EnvA

Camille Srun

► To cite this version:

Camille Srun. Détection et caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium* sp. et de *Giardia* sp. chez les hérissons européens (*Erinaceus europaeus*) arrivés au Chuv-FS de l'EnvA. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04155383

HAL Id: dumas-04155383

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04155383v1>

Submitted on 7 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Année 2023

**DÉTECTION ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE
CRYPTOSPORIDIUM SP. ET DE GIARDIA SP. CHEZ LES
HÉRISSONS EUROPÉENS (*ERINACEUS EUROPAEUS*)
ARRIVÉS AU CHUV-FS DE L'ENVA**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)
le 11 mai 2023

par

Camille SRUN

sous la direction de
Veronica RISCO-CASTILLO

JURY

Président du jury :	M. Karim ADJOU	Professeur à l'ENVA
Directrice de thèse :	Mme Veronica RISCO-CASTILLO	Maître de Conférences à l'ENVA
Examineur :	M. Pascal ARNÉ	Maître de Conférences à l'ENVA
Membre invité :	Mme Myriam THOMAS	Ingénieure d'étude à l'ANSES

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version janvier 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audgié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tirét	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Amé	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozé	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagré	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Maufré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudemann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émille	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, Professeur à l'ENVA, M. Karim Adjou,

Pour avoir accepté de présider la soutenance de thèse,

Hommages respectueux.

À Mme Veronica Risco-Castillo, Maître de Conférences à l'ENVA,

Pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse, pour vos nombreuses relectures et corrections, votre compréhension et votre enthousiasme.

Sincère reconnaissance.

À M. Pascal Arné, Maître de Conférences à l'ENVA,

Pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, pour votre implication au CHUF-FS et pour vos conseils avisés.

Sincères remerciements.

À Mme Myriam Thomas, Ingénieure d'étude à l'ANSES,

Pour m'avoir accompagnée lors de la partie expérimentale, pour votre aide et vos précieux retours.

Sincères remerciements.

À M. Bruno Polack, Maître de Conférences à l'ENVA,

Pour m'avoir accompagnée lors de la partie expérimentale, pour vos précieux conseils.

Sincères remerciements.

À Mme Delphine Chardon,

Pour ton accompagnement lors de la rédaction,

Sincère gratitude.

À ma famille, mes ami.e.s, à Gautier,

Merci !

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations.....	6
Introduction	7
Première partie : étude bibliographique	9
1. Les cryptosporidioses et les giardioses	9
1.1. <i>Epidémiologie des cryptosporidioses</i>	9
1.1.1. Taxinomie	9
1.1.2. Biologie	12
1.1.3. Potentiel zoonotique	13
1.1.4. Distribution et facteurs de risque pour l'Homme	15
1.2. <i>Epidémiologie des giardioses</i>	16
1.2.1. Taxinomie	16
1.2.2. Biologie	17
1.2.3. Potentiel zoonotique	19
1.2.4. Distribution et facteurs de risque.....	20
1.3. <i>Lésions, diagnostic et traitement des cryptosporidiose et des giardioses</i>	20
1.3.1. Mise en évidence clinique.....	20
1.3.2. Mise en évidence en laboratoire	21
1.3.3. Méthodes de contrôle et de prévention.....	30
2. Rôle de la faune sauvage comme réservoir	33
2.1. <i>Problématique dans le monde</i>	33
2.2. <i>Le Hérisson d'Europe (Erinaceus europeaeus) comme réservoir des cryptosporidies et des Giardia sp.</i>	37
2.3. <i>Gestion sanitaire dans les centres de sauvegarde de la faune sauvage</i>	38
Deuxième partie : étude expérimentale	41
1. Introduction	41
1.1. <i>Lieux de travail</i>	41
1.1.1. CHUV-FS.....	41
1.1.2. Biopôle – Laboratoire de Parasitologie	42
1.1.3. ANSES – équipe BIPAR	43
2. Matériels et méthodes	43
2.1. <i>Description de la cohorte et période de prélèvement</i>	43
2.2. <i>Réalisation du prélèvement coprologique</i>	44
2.3. <i>Comptage par immunofluorescence directe</i>	45
2.3.1. Identification par PCR.....	45
2.3.2. Identification de Cryptosporidium sp. et séquençage.....	46
2.3.3. Identification de Giardia sp. et séquençage	46
3. Résultats	47
3.1. <i>Statistique descriptive</i>	47
3.2. <i>Portage de Cryptosporidium sp. en fonction de l'âge</i>	49
3.3. <i>Portage de Giardia sp. en fonction de l'âge</i>	50
4. Discussion.....	53
4.1. <i>Limite du protocole</i>	53
4.2. <i>Espèces de Giardia sp. et de Cryptosporidium sp. obtenues confrontées aux données de la bibliographie</i>	54
4.3. <i>Prévalence globale de Cryptosporidium sp.</i>	55
4.4. <i>Prévalence globale de Giardia sp.</i>	56
4.5. <i>Evaluation de la prise en charge au CHUV-FS</i>	57

Conclusion.....	61
Liste des références bibliographiques	63
Annexe 1 : Noms scientifiques des espèces animales citées.....	73
Annexe 2 : Protocole d'immuno-marquage des kystes de <i>Giardia duodenalis</i> et/ou des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp. avec le kit Merifluor	74
Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN	75
1. Protocole de concentration des échantillons positifs.....	75
2. Protocole de réalisation des chocs thermiques.....	75
3. Protocole d'extraction de l'ADN	75
Annexe 4 : Protocole d'amplification et d'identification moléculaire de <i>Cryptosporidium</i> sp. :	77
1. PCR nichée de la séquence ribosomale 18S.....	77
1.1. <i>Amplification 1^{er} run</i> :	77
1.2. <i>Amplification 2nd run</i> :	78
1.3. <i>Migration sur gel</i>	78
2. PCR nichée du gène <i>gp60</i>	78
2.1. <i>Amplification 1^{er} run</i>	79
2.2. <i>Amplification 2nd run</i>	79
2.3. <i>Migration sur gel</i>	80
Annexe 5 : Protocole d'amplification et d'identification moléculaire de <i>Giardia</i> sp.....	81
1. PCR nichée du gène <i>gdh</i> :	81
1.1. <i>Amplification 1^{er} run</i>	81
1.2. <i>Amplification 2nd run</i>	81
1.3. <i>Migration sur gel</i>	82

Liste des figures

Figure 1 : Représentation d'un oocyste et d'un sporozoïte de <i>Cryptosporidium</i> sp.	9
Figure 2 : Cycle de <i>Cryptosporidium</i> sp.	12
Figure 3 : Représentation schématique d'un trophozoïte et d'un kyste de <i>Giardia</i> sp. d'après Ankarklev <i>et al.</i> (2010), AF = flagelle antérieure, PLF = flagelle latérale postérieure, VF = flagelle ventrale, CF = flagelle centrale	17
Figure 4 : Cycle de <i>Giardia duodenalis</i> chez un mammifère, modifié d'après Ankarklev <i>et al.</i> , (2010)	18
Figure 5 : Méthodes de détection des oocystes de <i>Cryptosporidium parvum</i> (a) Microscopie optique (montage humide), (b) coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, (c) coloration à l'auramine-phénol ; (d) immunofluorescence directe (isothiocyanate de fluorescéine sur la paroi) et coloration au diamidino-phénylindole (DAPI) de l'ADN ; (e) identique à (d) avec modification informatique de la couleur d'après Crestia <i>et al.</i> (2022)	22
Figure 6 : Trois méthodes de détection par la technique ELISA des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp. d'après Luka <i>et al.</i> (2022)	23
Figure 7 : Micrographie électronique à transmission de <i>Cryptosporidium parvum</i> à l'intérieur d'une vacuole parasitophore d'une cellule intestinale de souris. Un organite nourricier (*) est adhérent à la cellule hôte (HCM) au niveau d'une bande dense (DB). Échelle = 0,4 µm, d'après Benamrouz <i>et al.</i> (2012)	24
Figure 8 : (a) Kystes de <i>Giardia</i> sp., coloration à l'iode (lugol), MO, X1000 et (b) trophozoïtes de <i>Giardia</i> sp., coloration Giemsa, MO, X630 d'après Favennec (2012)	27
Figure 9 : Trophozoïte de <i>Giardia duodenalis</i> au microscope électronique à balayage (A : face dorsale, B : face ventrale) et à transmission (C : Coupe transversale de la région antérieure). A : flagelle antérieur, P : flagelle postéro-latérale, V : flagelle ventral, C : flagelle caudal, D : disque ventral, N : noyaux, , V : vésicules périphériques, flèches : axonèmes flagellaires, AB : zone dénudée, d'après Allain and Buret (2019)	27
Figure 10 : Nombre d'animaux des cinq espèces majoritaires arrivés au CHUV-FS en 2019 et 2020	42
Figure 11 : Évolution annuelle du nombre d'arrivées de hérissons d'Europe au CHUV-FS.....	42
Figure 12 : Images d'immunofluorescence de kystes de <i>Giardia</i> sp. (A) et de <i>Cryptosporidium</i> sp. (B) au microscope à fluorescence (d'après Balderrama Carmona <i>et al.</i> , 2017), semblables aux images observées lors de nos comptages.....	45
Figure 13 : Départements de provenance des hérissons d'Europe (sont exclus des représentations graphiques les 16 hérissons dont l'origine est inconnue, et sur la seconde représentation, l'unique hérisson provenant des Alpes-Maritimes est exclu)	48
Figure 14 : Nombre de hérissons excréteurs de de <i>Cryptosporidium</i> sp. en fonction de leur poids et du nombre d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp. excrétés	49

Figure 15 : Photographie du gel après migration du fragment *gp60* de *Cryptosporidium* sp. pour 5 prélèvements, dont une réaction sans amplification qui sera réitérée par la suite. Ces ADN seront ensuite séquencés. (Laboratoire ANSES UMR BIPAR).....50

Figure 16 : Nombre de hérissons excréteurs de *Giardia* sp. en fonction de leur poids et du nombre de kystes de *Giardia* sp. excrétés.....51

Figure 17 : Photographie du gel après migration du fragment de gène *gdh* de *Giardia duodenalis* réussie pour un prélèvement, la bande du témoin positif est également visible, de l'eau (TH2O) représente le puit du témoin négatif (Laboratoire ANSES UMR BIPAR).....52

Figure 18 : Photographie du gel après migration des fragments du gène *gdh* de *Giardia duodenalis* suite à la restriction par l'enzyme *NlaIV* pour 5 prélèvements, dont deux puits non conclusifs. Ces ADN seront ensuite séquencés. (Laboratoire ANSES UMR BIPAR).....53

Figure 19 : Nomenclature des sous types de *Cryptosporidium* sp. selon le gène *gp60* d'après Chalmers *et al.* (2019), présentant la composition du gène *gp60* et d'un exemple de nomenclature d'un sous type de *C. parvum*.....55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des espèces de <i>Cryptosporidium</i> sp. reconnues par Ryan <i>et al.</i> (2016) par ordre chronologique de découverte avant 2016.....	11
Tableau 2 : Principaux tests de diagnostic pour <i>Cryptosporidium</i> sp. chez l'Homme et les animaux en fonction de l'échantillon et de la méthode de détection (adapté d'après Chalmers et Katzer, 2013) :.....	25
Tableau 3 : Principaux test de diagnostic pour <i>Giardia</i> sp. chez l'Homme en fonction de l'échantillon et de la méthode de détection (adapté d'après Adeyemo <i>et al.</i> , 2018 ; Hooshyar <i>et al.</i> , 2019) :	29
Tableau 4 : Listes des espèces de <i>Cryptosporidium</i> sp. retrouvées chez au moins une espèce appartenant à la faune sauvage	34
Tableau 5 : Nombre de prélèvements effectués et nombre de hérissons prélevés par période d'analyse.....	44
Tableau 6 : Nombre d'hérissons répartis dans chaque catégorie de classement selon leur poids.	47
Tableau 7 : Portage de <i>Cryptosporidium</i> sp. en fonction de l'âge (donc du poids) des hérissons ..	49
Tableau 8 : Portage de <i>Giardia</i> sp. en fonction de l'âge (donc du poids) des hérissons	51

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFM : *Atomic force microscopy* (microscopie à force atomique)
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN : Acide ribonucléique
BET : Bromure d'éthidium
bg : gène codant pour la bêta-giardine de *Giardia* sp.
BIPAR : Biologie moléculaire et immunologie parasitaires
BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool* (outil informatique de recherche de similarité entre séquences nucléotidiques ou protéiques)
CFS : Clinique Faune Sauvage
CEDAF : Centre d'accueil de la faune sauvage
CHUV-FS : Centre hospitalier universitaire vétérinaire de la faune sauvage
COWP : *Cryptosporidium* oocyst wall protein (gène codant pour la protéine de paroi de l'oocyste de *Cryptosporidium* sp.)
cp15, *cp23* : gène codant l'antigène de surface de, respectivement, 15 kDa et 23 kDa du sporozoïte de *Cryptosporidium* sp.
DAPI : diaminido-phénylindole
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA : *Enzyme linked immunoabsorbent assays* (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
EIA : *Enzyme immunoassay* (dosage immuno-enzymatique)
ENVA : Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
F : *Forward primer* (amorce sens), son sens de présentation est 5'-3'
FDA : *US food and drug administration*
FISH : *Fluorescence in situ hybridization* (hybridation *in situ* en fluorescence)
FITC : *Fluorescein isothiocyanate* (isothiocyanate de fluorescéine)
gdh : gène codant la glutamate déshydrogénase
gp15 : gène codant la glycoprotéine de 60kDa de *Cryptosporidium* sp.
gp60 : gène codant la glycoprotéine de 60kDa de *Cryptosporidium* sp.
HIV : virus de l'immunodéficience humaine (en anglaise, VIH, human immunodeficiency viruse)
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (O'Leary *et al.*, 2021)
HSP70 : *70 kDa Heat Shock Protein* (protéine des stress thermique appartenant au génome de *Cryptosporidium* sp.)
ICZN : Code international de nomenclature zoologique
IMPDH : Inosine 5'-monophosphate déshydrogénase
ITS : internal transcribed spacer region (espaceur interne transcript)
MLG : *multilocus genotyping* (génotypage multilocus)
ML1 : *multilocus* 1 (appartenant au génome de *Cryptosporidium* sp.)
ML2 : *multilocus* 2 (appartenant au génome de *Cryptosporidium* sp.)
NBDHEX : 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol
NCBI : *National Center for Biotechnology Information* (Centre américain pour les informations bioinformatiques)
PCR : *Polymerase chain reaction* (réaction en chaîne par polymérase)
pH : Potentiel hydrogène
R : *Reverse primer* (amorce antisens), son sens de présentation est 5'-3'
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise (due au VIH virus de l'immunodéficience humaine)
ssU-rRNA : ARN de la sous-unité ribosomale
TAE : (Tampon) Tris Acétate EDTA
tpi : gène codant l'isomérase triose-phosphate
TRAP-C2 : thrombospondin-related adhesive protein, gène codant la thrombospondine adhésive (appartenant au génome de *Cryptosporidium* sp.)
UV : rayonnement ultra-violet

Introduction

La faune sauvage habitant dans les zones urbaines et périurbaines représente un phénomène écologique et sanitaire croissant dont découle la nécessité d'une meilleure compréhension des interactions Homme-animal. En effet, bien que les bienfaits apportés par la biodiversité urbaine ne soient pas négligeables (Schell *et al.*, 2021), le risque que ces animaux constituent un réservoir d'agents pathogènes pouvant inclure des parasites zoonotiques est réel. L'évolution de la sensibilité du grand public à l'égard de la condition animale pousse davantage d'individus à se préoccuper du sort des animaux sauvages en détresse. Les interactions qui en résultent mettent en lumière l'importance d'une information ciblée sur leur prise en charge.

Les centres de soins aux animaux de la faune sauvage ont pour fonction de recueillir des spécimens sauvages trouvés par les particuliers, qu'ils prennent en charge dans le but de les soigner, de les réhabiliter, avec pour objectif final leur réinsertion en milieu naturel. Il en est ainsi du Centre hospitalier universitaire vétérinaire de la faune sauvage (CHUV-FS) de l'École nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA). Il reçoit chaque année plusieurs milliers d'animaux sauvages de toute l'Île-de-France.

Le Hérisson européen (*Erinaceus europaeus*) est l'espèce de mammifère la plus représentée au centre, avec plus de 500 individus accueillis annuellement. Ces derniers présentent une diversité parasitaire importante, incluant aussi bien des parasites internes qu'externes. Certains de ces parasites sont spécifiques du Hérisson, tandis que d'autres présentent un spectre beaucoup plus large d'hôtes mammifères, y compris l'espèce humaine, et présentent donc un risque zoonotique plus ou moins important.

Au-delà des aspects thérapeutiques, une meilleure connaissance de ces parasites est donc primordiale pour estimer leur potentiel zoonotique auprès des intervenants manipulant chaque jour la faune sauvage, et notamment les hérissons européens, en particulier en centre de soins.

Les objectifs de cette thèse sont de détecter et caractériser les différentes souches présentes en région francilienne de deux groupes de protozoaires fréquents chez le Hérisson d'Europe : *Giardia* sp. et *Cryptosporidium* sp. ; d'évaluer les risques associés en centre de soins, pour cette espèce comme en matière de santé publique ; et d'identifier les mesures pouvant être prises pour limiter ces risques.

Pour atteindre ces objectifs, une première partie synthétisera les données bibliographiques disponibles sur l'importance du Hérisson européen dans les centres de soins de la faune sauvage, ainsi que sur les caractéristiques épidémiologiques et cliniques des giardioses et cryptosporidioses, leur diagnostic, les traitements et mesures de contrôle associées, ainsi que sur l'impact de ces maladies au sein de la faune sauvage et leur potentiel zoonotique.

Dans un second temps, nous présenterons la démarche expérimentale employée afin d'établir la présence de ces deux agents pathogènes chez des hérissons accueillis au CHUV-FS entre 2018 et 2020, ce qui nous a permis d'effectuer une étude épidémiologique et d'étudier la fréquence et les facteurs associés à la présence de ces deux parasites chez ce mammifère.

Nos résultats permettront ainsi d'établir une première estimation de la prévalence de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp. au sein de la population de hérissons d'Europe admise au CHUV-FS, d'en caractériser les souches et de proposer des mesures de prévention et de contrôle adaptées.

Première partie : étude bibliographique

Nous allons nous intéresser dans un premier temps aux parasites protozoaires *Giardia* sp. et *Cryptosporidium* sp.

1. Les cryptosporidioses et les giardioses

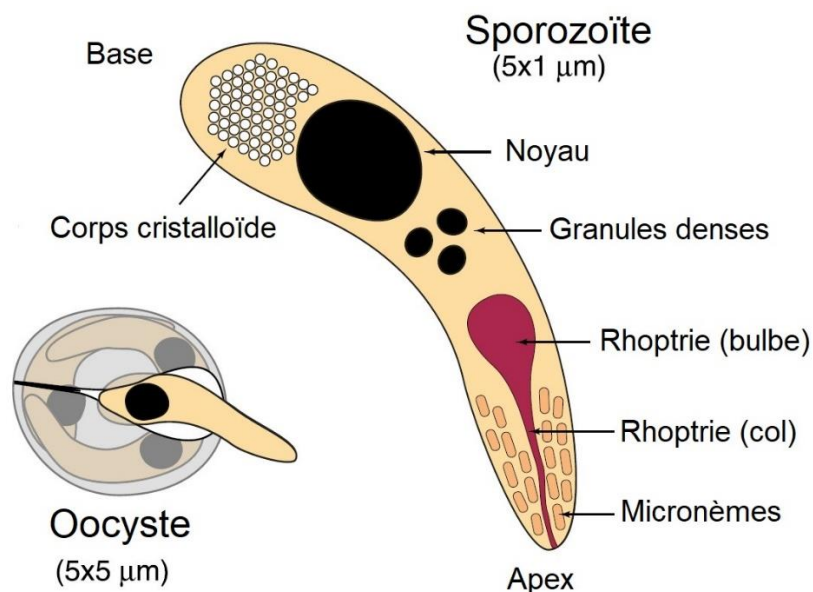
Les cryptosporidioses et les giardioses sont des protozooses infectieuses dues à la contamination par des eucaryotes unicellulaires du genre *Cryptosporidium* et *Giardia*, respectivement. Elles sont responsables de diarrhées chez de nombreuses espèces animales, l'Homme y compris. Le risque de zoonose est réel dès lors que l'être humain vit à proximité de vertébrés pouvant constituer des réservoirs de ces protozoaires.

1.1. Epidémiologie des cryptosporidioses

1.1.1. Taxinomie

Le genre *Cryptosporidium* appartient au domaine des Eucaryotes, à l'embranchement des *Apicomplexa*. Initialement placé dans la classe des Coccidies, sa classification a été revue il y a une dizaine d'années. Les *Cryptosporidium* sp. sembleraient plus proches des grégarines, micro-organismes protistes parasites des vertébrés, par leurs particularités biologiques, moléculaires et génétiques, tout en étant probablement issu d'un lignage différent. Ainsi certains scientifiques conviennent que les *Cryptosporidium* appartiennent à la classe des Gregarinomorpha et à la nouvelle sous classe Cryptogregarinorida (Adl *et al.*, 2019; Ryan *et al.*, 2021). Ce sont des organismes unicellulaires doté d'un complexe apical mais sans mitochondrie, qui présentent une motilité grâce à leur glidésome et dont la structure est visible dans la Figure 1 (Guérin et Striepen, 2020).

Figure 1 : Représentation d'un oocyste et d'un sporozoïte de *Cryptosporidium* sp.
(d'après Guérin et Striepen, 2020)



Il y a encore vingt ans, on considérait l'existence de seulement 8 espèces différentes au sein de ce genre (Dumoulin *et al.*, 2000) :

- *Cryptosporidium parvum*, parasite de nombreux mammifères,
- *C. muris* chez les Muridae (famille appartenant à l'ordre des rongeurs) et les ruminants,
- *C. felis* chez les chats¹,
- *C. wrairi* chez les cobayes,
- *C. meleagridis* et *C. baileyi* chez les oiseaux,
- *C. serpentis* pour les reptiles,
- et *C. nasorum* pour les poissons.

Par la suite, la découverte de nouvelles espèces de *Cryptosporidium* auparavant incluses dans *C. parvum* complique la classification. Sont notamment apparues *C. hominis*, *C. canis*, *C. suis* et *C. cuniculus* qui correspondaient aux génotypes humain, canin, porcine et cunicole de *C. parvum* respectivement (Guyot *et al.*, 2012).

Plus récemment, le séquençage a permis la différenciation d'un nombre plus élevé encore d'espèces. Une trentaine d'espèces de *Cryptosporidium* ont ainsi d'abord été répertoriées (Ryan *et al.*, 2016). D'autres travaux en décrivent jusqu'à quarante-quatre (Ryan *et al.* 2021), lesquelles satisfont aux critères de validité des espèces, à savoir : la description de la morphologie des oocystes, la description de sa spécificité vis-à-vis de son hôte naturel, sa caractérisation génétique ainsi que sa conformité au Code international de nomenclature zoologique (ICZN). Les principales espèces sont les suivantes par ordre de découverte (Tableau 1) :

¹ Les noms scientifiques des espèces animales citées dans ce manuscrit sont listées en Annexe 1.

Tableau 1 : Liste des espèces de *Cryptosporidium* sp. reconnues par Ryan *et al.* (2016) par ordre chronologique de découverte avant 2016

Adapté de (Zahedi *et al.*, 2015) et (Khan *et al.*, 2018)

Espèce	Nom du découvreur et année de la première description	Hôtes principaux
<i>C. muris</i>	TYZZER, 1907	<i>Mus musculus</i> (Souris)
<i>C. parvum</i>	TYZZER, 1912	Ruminants domestiques
<i>C. tyzzeri</i>	TYZZER, 1912	<i>Mus musculus</i> (Souris)
<i>C. meleagridis</i>	SLAVIN, 1955	<i>Meleagris gallopavo</i> (Dinde)
<i>C. wrairi</i>	VETTERLING, 1971	<i>Cavia porcellus</i> (Cobaye)
<i>C. serpentis</i>	BROWNSTEIN, 1977	<i>Pantherophis guttatus</i> (Serpent des blés), <i>Viperidae</i>
<i>C. felis</i>	ISEKI, 1979	<i>Felis sylvestris catus</i> (Chat)
<i>C. baileyi</i>	CURRENT, 1986	<i>Gallus gallus domesticus</i> (Poule domestique)
<i>C. varanii</i> (syn. <i>C. saurophilum</i>)	PAVALASEK, 1995	<i>Varanus prasinus</i> (Varan émeraude)
<i>C. galli</i>	PAVALASEK, 1999	<i>Spermestidae</i> , <i>Fringillidae</i> , <i>Gallus gallus domesticus</i> , <i>Tetrao urogallus</i> (Grand Tétrin), <i>Pinicola enucleator</i> (Durbec des sapins)
<i>C. andersoni</i>	LINDSAY, 2000	<i>Bos taurus</i> (Vache domestique)
<i>C. canis</i>	FAYER, 2001	<i>Canis lupus familiaris</i> (Chien)
<i>C. molnari</i>	ALVAREZ, 2002	<i>Sparus aurata</i> (Dorade royale), <i>Dicentrarchus labrax</i> (Bar commun)
<i>C. hominis</i>	MORGAN-RYAN, 2002	<i>Homo sapiens sapiens</i> (Humain)
<i>C. suis</i>	RYAN, 2004	<i>Sus scrofa</i> (Sanglier d'Europe)
<i>C. scophthalmi</i>	AVAREZ, 2004	<i>Scophthalmus maximus</i> (Turbot)
<i>C. bovis</i>	FAYER, 2005	<i>Bos taurus</i>
<i>C. fayeri</i>	RYAN, 2008	<i>Macropus giganteus</i> (Kangourou)
<i>C. fragile</i>	JIRKU, 2008	<i>Duttaphrynus melanostictus</i> (Crapaud masqué)
<i>C. macropodum</i>	POWER and RYAN, 2008	<i>Macropus giganteus</i> (Kangourou)
<i>C. ryanae</i>	FAYER, 2008	<i>Bos taurus</i>
<i>C. xiaoi</i>	FAYER, 2010	<i>Ovis aries</i> (Mouton)
<i>C. ubiquitousum</i>	FAYER, 2010	<i>Bos taurus</i>
<i>C. caniculus</i>	ROBINSON, 2010	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Lapin de garenne)
<i>C. ducismarci</i>	TRAVERSA, 2010	<i>Testudo marginata</i> (Tortue bordée)
<i>C. viatorum</i>	ELWIN, 2012	<i>Homo sapiens</i>
<i>C. scrofarum</i>	KVAC, 2013	<i>Sus scrofa</i>
<i>C. erinacei</i>	KVAC, 2014	<i>Erinaceus europaeus</i> (Hérisson européen)
<i>C. huwi</i>	RYAN, 2015	<i>Poecilia reticulata</i> (Guppy), <i>Paracheirodon innesi</i> (Néon bleu), <i>Puntius tetrazona</i> (Barbu de Sumatra)
<i>C. rubeyi</i>	LI, 2015	<i>Spermophilus beecheyi</i> (Écureuil terrestre de Californie)

La caractérisation moléculaire des souches de *Cryptosporidium* sp. a permis l'identification de sous-types ou génotypes grâce au séquençage du gène ribosomique 18S, du gène qui code la

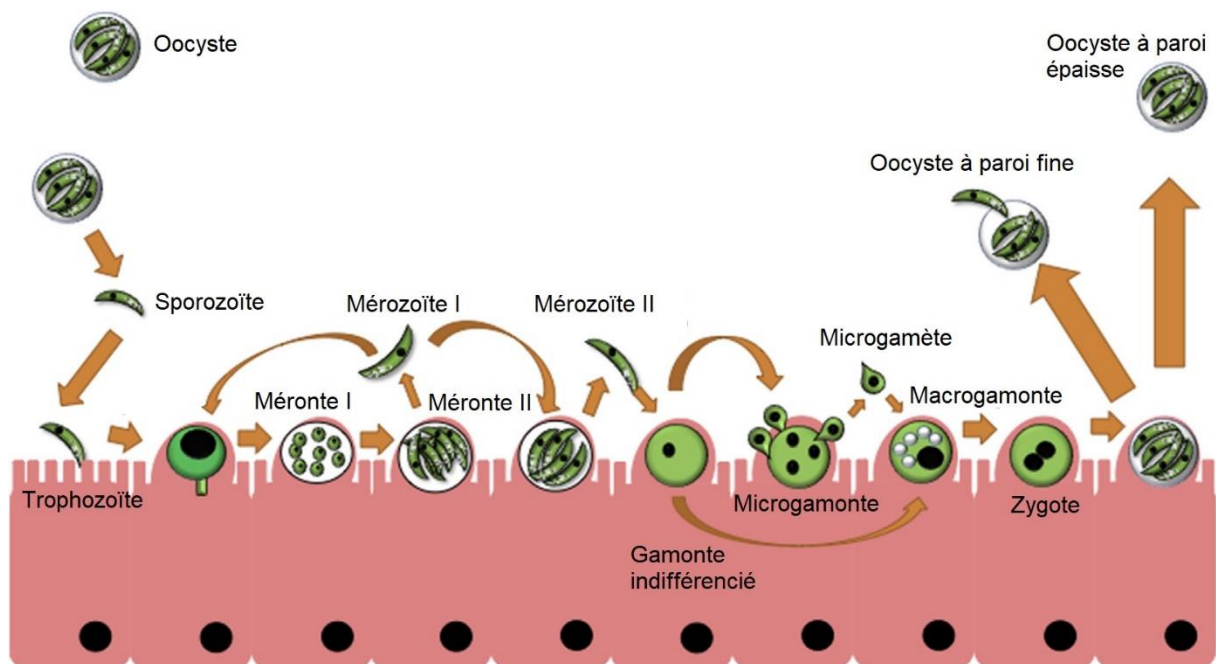
protéine de choc thermique de 70 kDa (HSP70), du gène codant pour la thrombospondine adhésive (TRAP-C2), de la glycoprotéine *gp60* (une glycoprotéine hypervariable de la membrane cytoplasmique de 60 kDa), puis par les séquences ITS1 et ITS2, du gène *COWP*, (Khan *et al.*, 2018), ainsi que le gène de la dihydrofolate-réductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) (O'Neil *et al.*, 2003) et historiquement, celle du gène de l'acétyl-co-enzyme A synthétase (Morgan *et al.*, 1998). Les microloci ML1 et ML2 ont été très utilisés dans l'identification des sous-espèces de *C. parvum* et *C. hominis*. Désormais, le génotypage multilocus (MLG) est nécessaire pour évaluer de manière adéquate les différentes espèces de *Cryptosporidium* sp. (O'Leary *et al.*, 2021).

1.1.2. Biologie

1.1.2.1. Cycle évolutif

Les cryptosporidies sont des coccidies à cycle homoxène. Elles n'impliquent qu'un seul hôte qui s'infecte à partir des éléments parasites dispersés dans l'environnement. Le cycle des cryptosporidies est complexe et alterne des phases extracellulaires et intracellulaires dans la lumière intestinale (Figure 2).

Figure 2 : Cycle de *Cryptosporidium* sp.
d'après Bones *et al.* (2019) et Thompson *et al.* (2005)



Le cycle commence par l'ingestion d'oocystes sporulés par un vertébré ; l'action combinée de la bile et de la trypsine à la température de 37°C conduit au dékystement dans la lumière intestinale (Reduker et Speer, 1985), et la libération de sporozoïtes motiles (Forney *et al.*, 1998).

Les sporozoïtes sont des cellules dotées d'organelles sécrétoires apicales (partie apicale visible sur la Figure 1). Dans des études sur *Toxoplasma gondii*, ces organelles sont composées de micronèmes (impliqués dans l'attachement à la cellule cible et la motilité), de granules denses (impliquées dans les modifications de la cellule hôte) et d'une rhoptrie (impliquée dans l'invasion de la cellule et l'échappement immunitaire), mais cela n'a été que supposé dans le cas de *Cryptosporidium* sp.. Les sporozoïtes sont motiles grâce au glidéosome (association d'actine et de myosine permettant à *Cryptosporidium* sp. de se mouvoir sur la matrice extracellulaire ou le

cytosquelette de la cellule hôte) (Frénal et Soldati-Favre, 2013). Ceux-ci vont se fixer à la surface d'un entérocyte et fusionnent avec les microvillosités, formant une vacuole parasitophore. Les mécanismes exacts de la fusion des membranes demeurent inconnus. Le parasite se trouve alors à l'intérieur de la cellule, en-dehors du cytoplasme, générant ainsi une forme classique observée au microscope électronique de « piédestal ». Puis le parasite puise ses ressources dans la cellule hôte à travers son organe nourricier formé de nombreuses microvillosités, et se transforme en trophozoïte (Guérin et Striepen, 2020).

Chaque trophozoïte débute ensuite deux mérogonies (multiplication asexuée) qui donnent six à huit mérozoïtes I. Chaque mérozoïte I est capable d'envahir une autre cellule et de recommencer ce cycle de multiplication asexuée. Les mérozoïtes I peuvent également donner chacun quatre mérozoïtes II, qui se transforment ensuite en micro- ou macrogamontes (aussi appelé mâle et femelle) au cours de la gamétogonie, dont les mécanismes ne sont pour l'instant pas clairs. Les microgamontes relarguent des microgamètes (ou gamètes mâles) qui fertilisent le macrogamonte (Bones *et al.*, 2019; Guérin et Striepen, 2020).

La fusion des noyaux mâle et femelle, aussi appelée sporogonie, entraîne la formation d'un zygote. Ce zygote diploïde réalise une méiose, donnant des individus haploïdes. Deux types d'oocystes déjà sporulés peuvent être formés, l'oocyste à paroi fine et l'oocyste à paroi épaisse. Les oocystes à paroi épaisse sont immédiatement infectants et libérés dans les matières fécales. L'oocyste est rond et fait environ 5 µm de diamètre, le diamètre étant légèrement variable entre les différentes espèces (Guérin et Striepen, 2020). Les oocystes à paroi fine font un cycle rétro-infectieux, c'est-à-dire qu'ils perdurent dans l'intestin et peuvent recommencer un cycle (Bones *et al.*, 2019).

1.1.2.2. Voies de contamination

Les oocystes constituent la forme infectante du parasite et sont extrêmement résistants dans le milieu extérieur (plus d'un an). La contamination s'effectue ainsi par voie fécale-orale, notamment par ingestion d'eau qui est le vecteur mécanique le plus connu et étudié concernant les cryptosporidioses. *Cryptosporidium* sp. étant résistant aux traitements usuels de l'eau, notamment le traitement au chlore, il peut s'agir d'eau potable, ou non (eau de baignade). La contamination de réseaux d'eau peut ainsi entraîner des contaminations massives.

La contamination de l'eau et des récoltes s'effectue principalement par l'épandage du lisier sur les champs ou un mauvais traitement des eaux usées (Glaberman *et al.*, 2002).

L'ingestion peut se faire également *via* de la nourriture (coques, fruits et légumes, viande), souvent contaminée au cours des processus de transformation (Baldursson et Karanis, 2011; Budu-Amoako *et al.*, 2011).

Les mouches peuvent aussi transporter des oocystes de *C. parvum* sur leur cuticule et dans leur tube digestif, mais la transmission aux humains n'a pas été prouvée (Dumoulin *et al.*, 2000).

1.1.3. Potentiel zoonotique

Chez l'Homme, plus de 20 espèces et génotypes ont été décrits : *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. muris*, *C. suis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. scrofarum*, *C. tyzzeri*, *C. erinacei*, *C. occultus*, *C. wiaoi*, *C. ditrichi* et des génotypes non classés à ce jour (Schoch *et al.*, 2020), à savoir les génotypes du cheval

(*Cryptosporidium* Horse genotype), de la mouffette (*Cryptosporidium* skunk genotype) et du tamia (*Cryptosporidium* chipmunk genotype I). (Lebbad *et al.*, 2021; Ryan *et al.*, 2016).

C. hominis et *C. parvum* constituent à elles seules entre 90 % et 95 % des infections humaines (Guyot *et al.*, 2012; Ryan *et al.*, 2021).

Les sous types de *C. parvum* les plus retrouvés chez les humains et les animaux, identifiés grâce au génotypage de la glycoprotéine 60 kDa, sont le sous type IIa, à la fois en Europe et aux Etats-Unis, retrouvé surtout chez les veaux, et le sous type IIId, aussi présent chez les bovins, plus occasionnellement. Le sous type IIc, quant à lui n'est retrouvé que chez l'humain (Xiao et Fayer, 2008).

Les cryptosporidioses causées par *C. hominis* et *C. parvum* sont suivies, en termes d'incidence, par celles engendrées par *C. meleagridis*, puis *C. caniculus* (en raison d'une épidémie en Angleterre en 2008 ayant touché 23 personnes (Puleston *et al.*, 2013), les autres cas étant sporadiques), enfin *C. canis* et *C. felis*, tous deux représentant moins de 5% des cas de cryptosporidiose d'après Ryan *et al.* (2016).

Ces parasites n'étant pas très spécifiques de leurs hôtes, les plus fortes preuves plaident en faveur du potentiel zoonotique de *Cryptosporidium* sp. sont les contaminations directes d'étudiants vétérinaires en contact avec des veaux infectés, de chercheurs en contact avec des veaux infectés, d'enfants ayant travaillé dans des champs et des marchés (Xiao et Fayer, 2008) et une contamination de bénévoles en centre de soin (Davis *et al.*, 2022). De plus, *C. hominis* est plus commun dans les aires urbaines alors que *C. parvum* est plus commun dans les milieux ruraux, soutenant d'autant plus le potentiel zoonotique de ce dernier (Xiao et Fayer, 2008).

Les animaux d'élevage sont ainsi considérés comme une source zoonotique importante : le risque de déclencher une cryptosporidiose est accru en cas de visite de ferme (Goh *et al.*, 2004) et il est rapporté des contaminations suite à la visite de fermes pédagogiques (Dupouy-Camet *et al.*, 2018). Les veaux sont le réservoir principal de *C. parvum*, et sont donc considérés comme la source principale de cryptosporidiose zoonotique.

D'autres animaux d'élevage sont également incriminés. Ainsi, les ovins sont une autre source potentielle de cryptosporidiose zoonotique, car 90 % des souches retrouvées chez cette espèce sont considérées comme zoonotiques. En revanche, l'incidence basse de la cryptosporidiose ovine en fait une source d'infection mineure pour les humains (Robertson, 2009).

Le contact avec des animaux de compagnie n'a pas été considéré comme un risque zoonotique pour la cryptosporidiose (Goh *et al.*, 2004). Pourtant, *C. canis* et *C. felis* sont plus souvent retrouvés dans des études menées dans les pays en voie de développement (Ryan *et al.*, 2016), laissant supposer une contamination par des chiens et chats féraux.

Enfin, il existe encore peu d'études concernant le risque lié à la faune sauvage, qui est encore controversé (Dupouy-Camet *et al.*, 2018) ; cependant, l'empiètement de leur territoire par les humains entraînant de plus en plus d'interactions avec les animaux sauvages, il convient de s'intéresser à ce risque de plus en plus présent, déjà à l'origine de maladies émergentes comme les paramyxoviroses ou plus récemment Ebola (Cunningham *et al.*, 2017).

1.1.4. Distribution et facteurs de risque pour l'Homme

Cryptosporidium sp. est cosmopolite, il est retrouvé dans 95 pays, sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique. La cryptosporidiose humaine a une prévalence estimée entre 0,5 et 2 % dans les pays industrialisés, et d'environ 10 % dans les pays en développement. L'étude réalisée par Dong *et al.* (2020) est une méta-analyse de données concernant la prévalence des infections dues à *Cryptosporidium* sp. dans le monde et ayant exclu les épidémies de l'étude pour plus de représentativité. Sur les 69 pays sur laquelle cette analyse portait, la prévalence globale de *Cryptosporidium* sp. a été estimée à 7,6 %. Dans les pays développés, dont la France fait partie, la prévalence a été estimée à 4,3 %.

Il est reconnu que dans 70 % des cas de gastro-entérites humaines, l'agent causal n'est pas identifié. Les données concernant la prévalence de *Cryptosporidium* sp. sont donc difficiles à évaluer par ce biais (O'Leary *et al.*, 2021).

Habiter un pays en voie de développement est un facteur de risque d'infection à *Cryptosporidium* sp. : la prévalence est plus faible dans les pays développés que ceux en voie de développement, et la prévalence est plus élevée dans les zones de bidonville que dans les mêmes villes d'un pays (Dong *et al.*, 2020). Dans les pays en voie de développement, en raison notamment de la malnutrition et de l'absence de moyens de traitement des co-infections comme le SIDA, qui causent tout deux des déficits immunitaires, la prévalence d'infection à *Cryptosporidium* sp. est plus élevée. Les patients atteints du SIDA ont un déficit immunitaire engendré par la destruction des lymphocytes CD4+ (Guyot *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018).

Un assainissement et un contrôle insuffisant des réseaux d'eau potable est un facteur de risque d'infection à *Cryptosporidium* sp.. Une étude ayant recensé 199 épidémies dues à la transmission hydrique de protozoaires parasitaires de 2004 à 2010 a prouvé que *Cryptosporidium* sp. était l'agent étiologique dans 60,3 % (120/199) des foyers. L'étude portait sur des épidémies intervenues à 94,1 % en Amérique du Nord, Australie et Europe (Baldursson et Karanis, 2011). L'étude d'Efstratiou *et al.*, (2017) couvre les cinq années suivantes, entre 2011 et 2016, et nous y retrouvons les mêmes ordres de grandeur : *Cryptosporidium* sp. a été responsable de 63 % des épidémies déclarée d'origine hydrique sur 239 épidémies où l'agent infectieux a pu être identifié. Dans cette étude, seules 9 % (35/239) des épidémies ont eu lieu en Europe. Elles ont eu lieu principalement en Irlande et Royaume Uni, seules cinq sont signalées pour l'Europe continentale : en Suède, en Norvège en Belgique et en Allemagne (Efstratiou *et al.*, 2017).

Un jeune âge (inférieur à 5 ans) est aussi un facteur de risque d'infection par *Cryptosporidium* sp.. Une étude chez plus de 22 000 enfants d'Asie et d'Afrique âgés entre 0 et 59 mois a démontré que *Cryptosporidium* sp. était la deuxième plus grande cause de diarrhée après les rotavirus. C'était par ailleurs un facteur de mortalité chez les enfants âgés entre 12 et 23 mois (Kotloff *et al.*, 2013). Dans la méta-analyse de Dong *et al.* (2020) la prévalence chez les enfants de moins de 5 ans était de plus de 10 %, contre 4,5 % chez les adultes.

Il est important de rappeler qu'un jeune âge est un biais sur la répartition par âge de la prévalence d'une maladie, ce biais étant lié par exemple au comportement des spécialistes plus à même de faire des tests poussés et à celui des parents de faire réaliser ces tests à leur enfant. Ce biais joue aussi sur la prévalence de *Cryptosporidium* sp. chez les enfants (O'Leary *et al.*, 2021). Une étude portant sur une épidémie de cryptosporidiose survenue en 2007 en Irlande concluait que 57 % (64/182) des patients avaient moins de 15 ans, et 22 % (40/182) moins de 3 ans (Pelly *et al.*, 2007). Ces résultats peuvent peut-être être extrapolés à la France, mais les données manquent, en

effet car tester la présence de *Cryptosporidium* sp. ne fait pas partie du protocole routinier des analyses coproscopiques, sauf mention contraire d'un médecin, au contraire de l'Irlande (O'Leary et al., 2021).

La proximité avec des animaux est un facteur de risque d'infection à *Cryptosporidium* sp.. Dans tous les pays étudiés par la méta-analyse de Dong et al. (2020), la prévalence est plus élevée en zone rurale et chez les humains en contact avec des animaux qu'en zone urbaine, soulignant le risque zoonotique. Vis-à-vis du risque zoonotique, la multiplication des contacts avec la faune domestique comme sauvage constitue un facteur de plus en plus présent, comme démontré dans la partie précédente. Ceci est particulièrement vrai pour le cas qui nous occupe ici : les contacts avec la faune sauvage en centre de soins

Ainsi ces études mettent en évidence les facteurs de risque d'infection à *Cryptosporidium* sp. et sont : l'utilisation d'eau non suffisamment assainie, le jeune âge, la zone d'habitation (zone rurale, ou zones insalubres comme les bidonvilles) et les pays en voie de développement ainsi que le contact avec les animaux.

1.2. Epidémiologie des giardioses

Les giardioses sont des protozooses infectieuses dues au développement de *Giardia* sp. dans l'intestin d'animaux vertébrés, causant une grande variété de symptômes gastro-intestinaux. La giardiose est l'infection parasitaire intestinale la plus fréquente chez l'Homme (Kucik et al., 2004).

1.2.1. Taxinomie

Le genre *Giardia* appartient au domaine des Eucaryotes, embranchement des *Eozoa*, sous-embranchement des *Metamonada* (ou à l'embranchement *Sarcomastigophora* selon les scientifiques), classe des *Eopharyngia*, ordre des *Diplomonadida*, famille des Hexamitidés, et à la sous-famille des *Giardiinae* (Bussiéras et Chermette, 2002; Ryan et al., 2021).

Il existe neuf espèces de *Giardia* sp. aujourd'hui, nommées en lien avec leur espèce hôte présumée. Nous pouvons citer *Giardia agilis* chez les amphibiens, *Giardia ardeae* et *Giardia psittaci* chez les oiseaux, *Giardia muris* et *Giardia microti* chez les rongeurs, et enfin, *Giardia duodenalis* (aussi appelée *G. intestinalis*, ou *G. lamblia*) chez les mammifères, et plus récemment les espèces *G. varani* décrite originellement chez le Varan du Nil, *Giardia cricetarum* chez les hamsters et *Giardia peramelis* chez les bandicoots (Ryan et al., 2019, 2021).

Giardia duodenalis est la même espèce que *G. intestinalis* et *G. lamblia*. Cette espèce est nommée d'après le scientifique Vilém Dušan Lambl, ou d'après sa localisation chez ses hôtes (duodénum et intestin). Il n'y a pas de consensus sur le nom scientifique (Ryan et al., 2021), les trois noms sont donc admis mais nous utiliserons *G. duodenalis* par la suite.

Giardia duodenalis est un complexe multi-espèces comprenant 8 génotypes propres nommés assemblages. Les assemblages présentent des différences génétiques mais pas de différences morphologiques en microscopie électronique, ils ne peuvent donc pas être des espèces à part entière (Adam, 2021). L'assemblage A concerne les mammifères, l'assemblage B concerne principalement l'Homme (mais également d'autres mammifères), les assemblages C et D concernent les canidés, l'assemblage E concerne les artiodactyles (ruminants, porcs et Camélidés), l'assemblage F concerne le Chat et le Porc, l'assemblage G, les rongeurs, l'assemblage H, le Phoque gris et le Goéland argenté, et nous pouvons aussi citer historiquement le génotype quenda,

retrouvé chez les marsupiaux, qui a ensuite été classé en espèce, *Giardia paramelis* (Ryan *et al.*, 2021).

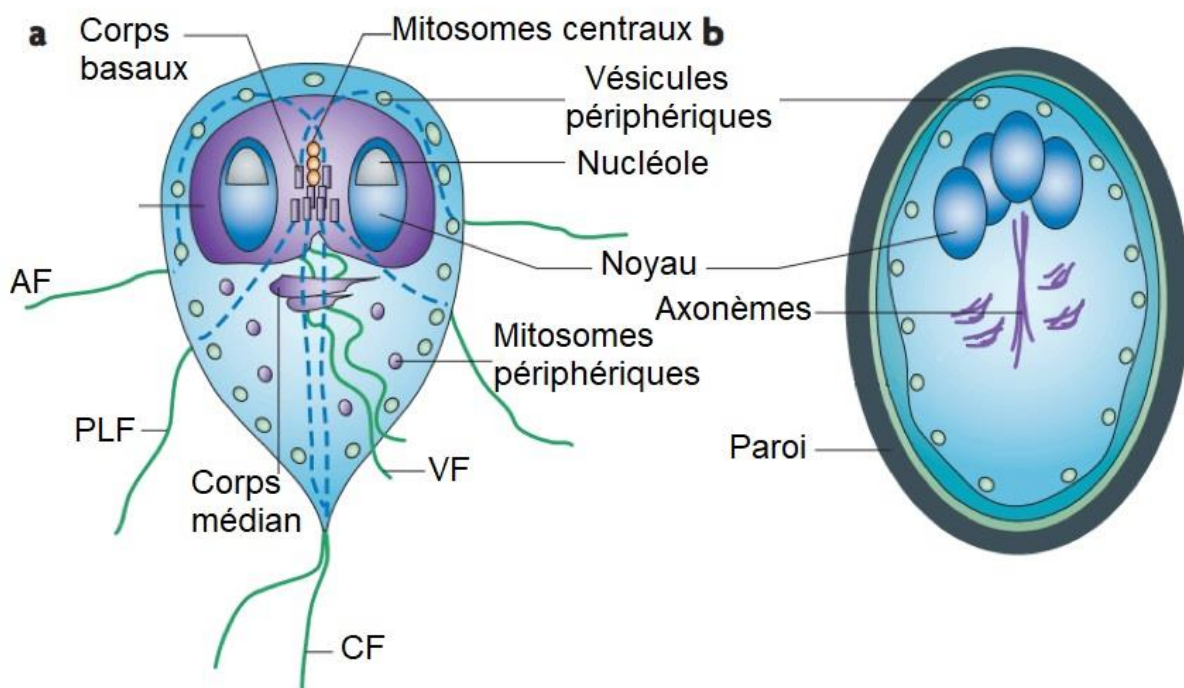
Différenciable grâce au locus du gène *gdh* (glutamate déshydrogénase), l'assemblage A peut être divisé en quatre sous-assemblages, aussi appelés sous-groupes : AI, AII, AIII et AIV. Les assemblages B et E comportent eux aussi plusieurs sous-types (Feng et Xiao, 2011; Ryan et Cacciò, 2013).

1.2.2. Biologie

1.2.2.1. Cycle évolutif

Tout comme les cryptosporidies, les *Giardia* sp. sont des parasites à cycle direct. Le cycle de *Giardia* sp. se déroule sous deux formes : la forme de kyste et la forme de trophozoïte. Le trophozoïte a une forme de poire, est motile dans l'intestin, et constitué de huit flagelles et d'un disque ventral permettant son adhésion aux cellules intestinales d'où il tire ses nutriments (Figure 3). Il présente deux noyaux. C'est la forme de réplication de *Giardia* sp.. Lors de son cycle, le trophozoïte s'enkyste, donnant ainsi une forme très stable dans l'environnement, le kyste, qui peut être transmis à un autre hôte. Le kyste présente quatre noyaux et une double paroi. La paroi externe est recouverte de filaments (Adam, 2021).

Figure 3 : Représentation schématique d'un trophozoïte et d'un kyste de *Giardia* sp. d'après Ankarklev *et al.* (2010), AF = flagelle antérieure, PLF = flagelle latérale postérieure, VF = flagelle ventrale, CF = flagelle centrale



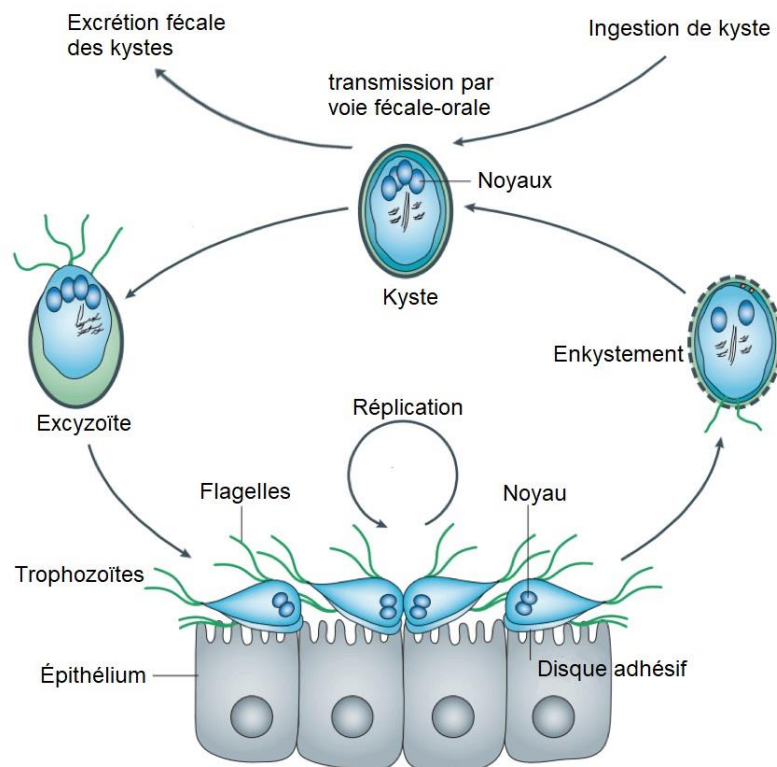
Le cycle de *Giardia* sp. commence par l'ingestion de kystes par un hôte. Le dékystement est stimulé par l'acidité stomacale et l'exposition à la bile (Kucik *et al.*, 2004), mais est possible à pH neutre également (Feely *et al.*, 1991). La paroi est ouverte à un pôle et un excyzoïte est relargué. Cet excyzoïte possède, comme l'ookyste, quatre noyaux quadriploïdes.

L'excystozoïte va réaliser deux cycles de division et subir des modifications morphologiques, qui résultent en l'obtention de quatre trophozoïtes motiles grâce à leurs huit flagelles, et avec chacun deux noyaux diploïdes (Adam, 2021).

Les trophozoïtes se fixent sur les cellules intestinales de l'intestin grêle et tirent de leur cellule hôte leurs nutriments. Ils possèdent plusieurs organelles développées, son disque ventral permet son adhésion aux *villi* intestinaux (et donc de résister au péristaltisme), un corps médian et un *funis*, dont la fonction reste à élucider. Les trophozoïtes ont un appareil de biosynthèse et de production énergétique très réduit et tirent les nutriments de la cellule hôte, notamment du glucose et des acides aminés (Adam, 2021). L'attachement aux cellules intestinales, par le biais de l'activation de signaux intra-cellulaires, finit par entraîner l'apoptose des cellules intestinales, et donc déclenche les signes cliniques (diarrhée) par destruction de la muqueuse intestinale (Dixon, 2021). Les trophozoïtes réalisent une division toutes les six à huit heures (Hagen *et al.*, 2020), la fission est binaire, et a lieu dans le plan longitudinal, chaque trophozoïte hérite de la moitié des flagelles du trophozoïte parent. Il n'y a pas de preuves de reproduction sexuée chez *Giardia sp.*

Les mécanismes d'initiation de l'enkystement ne sont pas encore élucidés, les acides gras entraînent l'enkystement, et il est probable qu'il y ait un échange de molécules entre trophozoïtes entraînant des enkystements massifs (Adam, 2021). La présence des acides biliaires et du pH alcalin semble stimuler l'enkystement (Hagen *et al.*, 2020). Le trophozoïte se transforme en kyste par deux cycles de réplication et une seule division nucléaire, formant ainsi un kyste à quatre noyaux quadriploïdes (Adam, 2021). Le kyste est ovale, et mesure huit à douze micromètres de longueur (Dixon, 2021). Les kystes sont alors libérés dans les matières fécales et directement infectants.

Figure 4 : Cycle de *Giardia duodenalis* chez un mammifère, modifié d'après Ankarkev *et al.*, (2010)



1.2.2.2. Voies de contamination

Les kystes de *Giardia* sp. constituent la forme infectante, par le biais de la voie fécale-orale. La transmission peut être directe ou indirecte, par le biais d'eau ou de nourriture contaminés (Garcia-R *et al.*, 2017 ; Dixon, 2021). En effet, la petite taille, la résistance du kyste à la désinfection à la chlorure et aux températures basses, et sa capacité à rester viable sur de longues périodes dans l'environnement lui permettent de contaminer l'environnement et donc possiblement des aliments. En effet, le kyste a une activité métabolique réduite entre 10 % et 20 % de celle du trophozoïte, ce qui lui permet de survivre longtemps, préférentiellement dans des milieux frais et humides (Adam, 2021).

L'eau est une importante voie de contamination. Une étude relative à la transmission par l'eau des protozoaires parasites de 2004 à 2010 a prouvé que *G. duodenalis* était l'agent étiologique dans 35,2 % des épidémies d'après une méta-analyse de 199 épidémies (Baldursson et Karanis, 2011). Dans une autre étude, sur 132 épidémies de giardiose humaine documentées depuis 1954 dans le monde, 104 étaient dues à une contamination de l'eau de boisson, la transmission pouvant ensuite se faire entre humains par contact et ingestion de kystes (Feng et Xiao, 2011).

La nourriture est également une voie de contamination, en effet, la présence de *Giardia duodenalis* dans la nourriture cause environ 28,2 millions de cas de diarrhée humaine dans le monde chaque année. Des kystes ont été détectés dans des types de nourritures variés, incluant les produits laitiers, viandes, crustacés, fruits et légumes (Ryan *et al.*, 2019).

1.2.3. Potentiel zoonotique

Le risque zoonotique de *Giardia* sp. n'a pas été démontré aussi clairement que pour les cryptosporidies et le rôle des animaux demeure controversé. Seule l'espèce *Giardia duodenalis* est retrouvée chez l'espèce humaine (Sprong *et al.*, 2009), en particulier les assemblages A et B, et dans une moindre mesure les assemblages C, D et F (Feng et Xiao, 2011; Ryan *et al.*, 2019). L'étude de Sprong *et al.* (2009) s'étant intéressée aux génotypes de multiples isolats issus d'humains et d'animaux considère que le potentiel zoonotique est évident pour les assemblages A et B. De plus, seuls quelques génotypes de l'assemblage A (basés sur l'analyse de plusieurs loci) semblent avoir un réel potentiel zoonotique. Le sous assemblage AI est considéré comme zoonotique mais est principalement retrouvé chez les animaux tandis que AII est principalement retrouvé chez les humains (Adam, 2021).

Il semblerait que c'est la contamination d'humain à humain qui prime, particulièrement dans les structures à risque tel que les centres de soins ou les maisons de retraite (Dixon, 2021). Dans l'étude de Feng et Xiao (2011), seules deux épidémies sur les 132 répertoriées sont originaires d'une source animale : la première par consommation d'un aliment contaminé par des fèces de rongeurs et la seconde *via* une soupe faite à partir d'abats de mouton contaminés.

Par ailleurs, il se trouve que les assemblages A et B ne sont pas les assemblages prédominants chez de nombreuses espèces d'animaux. Chez les moutons, les chèvres et les porcs, l'assemblage E est le génotype prédominant (Robertson, 2009). Chez les chiens, les génotypes C et D sont prédominants, alors que c'est plutôt le génotype F chez le Chat. Tous sont considérés comme peu zoonotiques.

Concernant les animaux sauvages, il y a peu de preuves concernant la contamination directe ou indirecte d'humains. Les assemblages A, B, C, D, E et G sont rapportés dans la faune sauvage

européenne (Sprong *et al.*, 2009), les deux premiers représentant 74 % des 172 échantillons analysés.

L'étude de Feng et Xiao, (2011) rapporte le rôle probable de réservoir du Castor du Canada ; en effet, cette espèce est principalement porteuse des assemblages A et B, et plusieurs cas de giardioses ont été décrits chez des randonneurs s'abreuvant de l'eau des lacs ou des rivières, en particulier dans les États de Washington, du New Hampshire et du Nevada, mais des études démontrant clairement le passage animal/humain restent rares. De plus, la contamination de la nourriture par les animaux est probablement sous-estimée, elle engendre surtout des cas sporadiques, peu déclarés (Adam, 2021).

1.2.4. Distribution et facteurs de risque

Giardia sp. est un protozoaire très courant, il infecte plus de quarante espèces animales et est responsable de 280 millions de cas de diarrhée humaine chaque année, toutes voies de transmission confondues (Ryan *et al.*, 2019). Le taux de prévalence de la giardiose s'étale de 2 à 7 % dans les pays développés et de 20 à 30 % dans les pays en voie de développement (Dixon, 2021).

Les facteurs de risques sont : boire de l'eau non traitée ou consommer des aliments produits dans de mauvaises conditions hygiéniques (épandage de fumier sur des légumes par exemple), utiliser les eaux de loisirs (telles que les piscines ou les eaux de baignades naturelles), avoir des relations homosexuelles entre hommes, ainsi qu'avoir des contacts directs avec des animaux (éleveurs, vétérinaires, etc.). De plus, les enfants, les personnes âgées ou immunodéprimées, les voyageurs, sont plus à risque de développer des signes cliniques (Adam, 2021; Dixon, 2021; Ryan *et al.*, 2019).

En Nouvelle-Zélande, une étude a démontré que le contact avec les animaux d'élevage était associé avec un risque plus important d'infection chez les adultes, alors que le contact avec les animaux de compagnie ne l'était pas. Une autre étude menée au Royaume-Uni a démontré la présence d'une association entre la giardiose humaine et l'exposition aux animaux de rente et aux carnivores domestiques, en particulier le Porc, le Chien et le Chat ; cette association n'a pas été retrouvée dans d'autres études (Feng et Xiao, 2011). Enfin, Adam, (2021) souligne que dans des études plus récentes, le contact avec les animaux n'a pas été identifié comme étant un facteur de risque, bien que ce résultat soit controversé.

1.3. Lésions, diagnostic et traitement des cryptosporidiose et des giardioses

1.3.1. Mise en évidence clinique

Chez l'espèce humaine comme chez d'autres espèces animales, les cryptosporidioses et les giardioses sont toutes les deux associées à des symptômes digestifs, en particulier des diarrhées plus au moins aiguës selon l'âge et l'immunocompétence de l'hôte atteint.

Dans le cas de cryptosporidiose, les principaux signes cliniques chez l'Homme apparaissent environ une semaine après ingestion des kystes. Ils sont caractérisés par l'émission de selles aqueuses à mucoïdes trois à six fois par jour (diarrhée profuse non hémorragique), associées à de l'anorexie, des douleurs abdominales, des nausées, des maux de tête, mais peuvent être parfois

asymptomatiques (Cama *et al.*, 2008; Chalmers et Davies, 2010; Dupont et Okhuysen, 1995). Chez les adultes immunocompétents les cas sont auto-résolutifs en environ deux semaines, mais la cryptosporidiose peut être létale dans le cas des personnes immuno-déprimées (Pozio *et al.*, 1997). Certaines infections sont récurrentes. Dans d'autres cas, la cryptosporidiose peut avoir des effets sur le long terme (arthrite, possiblement associée avec conjonctivite et urétrite (Syndrome de Reiter), des maux de têtes récurrents, ou encore de la fatigue (Chalmers et Davies, 2010). Chez les veaux, la présentation clinique typique est constituée de diarrhée, abattement, déshydratation, dysorexie et parfois de ténésme (Adkins, 2022). Enfin, concernant les signes cliniques engendré par une infection à *Cryptosporidium* sp. dans la faune sauvage, peu d'information sont disponibles (Appelbee *et al.*, 2005), les animaux sauvages étant souvent asymptomatiques (Jones et Tardieu, 2021). Il est toutefois rapporté la présence de diarrhée chez des rats-laveurs ayant la cryptosporidiose en centre de soin (Davis *et al.*, 2022).

Dans le cas de giardiose, les symptômes apparaissent après une période d'une à deux semaines, et sont constitués de nausées, malaises, crampes, perte de poids, diarrhée et stéatorrhée chez l'humain, même immunocompétent (Dixon, 2021; Einarsson *et al.*, 2016). Les infections peuvent également être asymptomatiques, ou causer de légers symptômes auto-résolutifs. Certaines infections peuvent devenir chroniques, et être associées à des allergies alimentaires, à un syndrome du côlon irritable, une fatigue chronique, de l'arthrose, et chez les individus en développement, à des retards de croissance (Ryan *et al.*, 2019).

Chez les animaux de rente, la giardiose, même non symptomatique entraîne des baisses de croissance. Elle provoque également des diarrhées, pertes de poids, retard de croissance et parfois la mort. Chez les chiens et chats, elle est plutôt associée à de la diarrhée mucoïde chez les individus les plus jeunes (Dixon, 2021). De même que pour la cryptosporidiose, peu d'informations sur les signes cliniques de la giardiose dans la faune sauvage sont disponibles (Appelbee *et al.*, 2005), les animaux sauvages, tels que le Chien de prairie (Kamyngkird *et al.*, 2022), ou divers marsupiaux australiens (Ryan et Power, 2012; Thompson *et al.*, 2008), étant souvent asymptomatiques. Une étude rapporte néanmoins la présence de selles molles et d'amaigrissement chez des chiens de prairies captifs infectés par *Giardia duodenalis*. Ces signes s'étant manifestés après la capture, il est probable que l'infection ait été aggravée par le stress engendré par la captivité (Roellig *et al.*, 2015).

Des cas d'infections mixtes à *Cryptosporidium* sp. et *G. duodenalis* ont été rapportés chez le veau, à l'origine, là encore, de diarrhées parfois mortelles (El-Alfy et Nishikawa, 2020; Matsuura *et al.*, 2017).

1.3.2. Mise en évidence en laboratoire

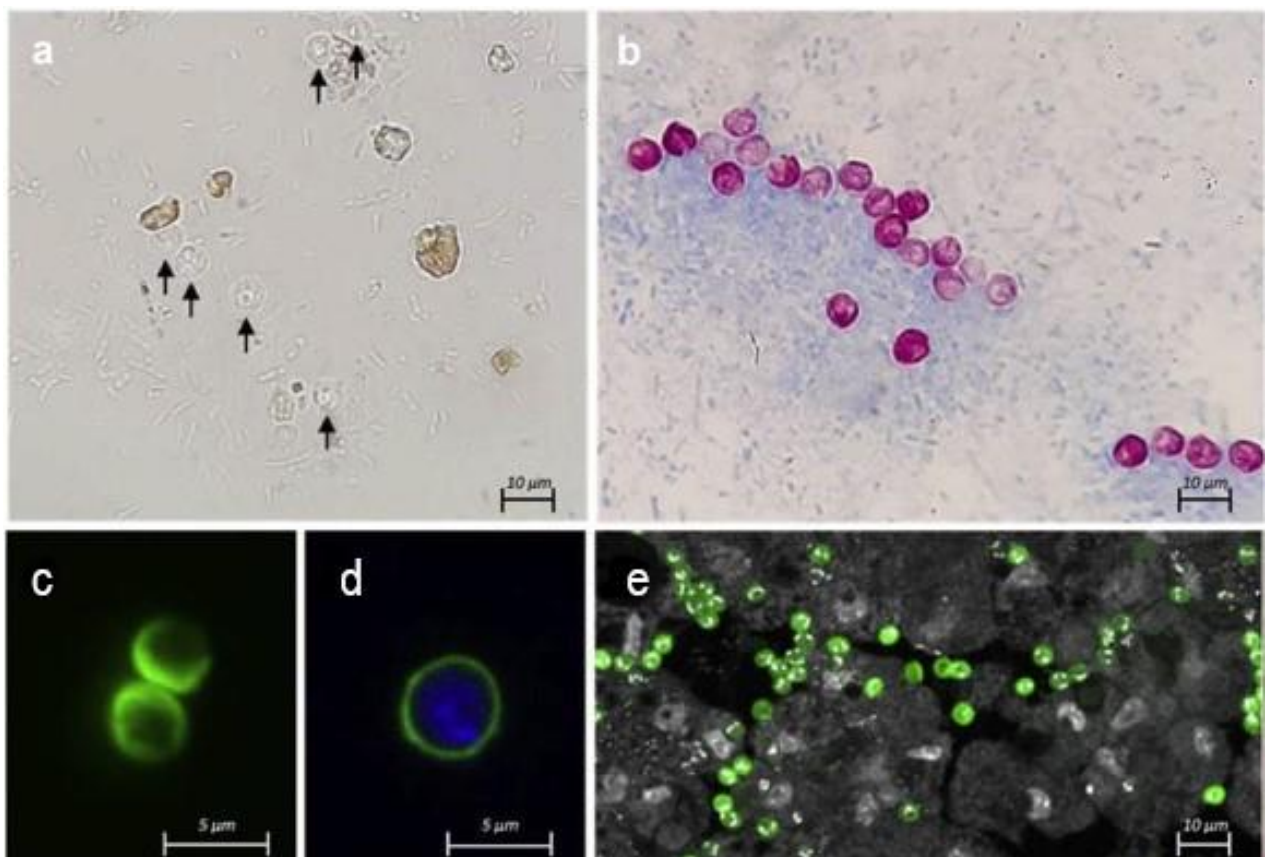
La mise en évidence de *Cryptosporidium* sp. peut se faire par coloration des oocystes présents dans la matière fécale, comme les colorations à l'acide-rapide : Ziehl-Neelsen modifiée (*Acid Fast modified Ziehl-Neelsen*, voir Figure 5) qui est la plus utilisée en laboratoire, ou la coloration de Kinyoun. La coloration négative de Heine modifiée avec utilisation du vert de Malachite semble également donner de bons résultats de détection pour un coût faible. Les colorations au bleu de méthylène et safranine, ou celle May-Grünwald Giemsa donnent des résultats très médiocres sur les oocystes de *Cryptosporidium* sp. (Adeyemo *et al.*, 2018; O'Leary *et al.*, 2021).

La détection des oocystes peut également se faire par immunofluorescence. Dans un premier temps, dans le cas de l'eau, les oocystes sont isolés du reste des contaminants par fixation sur un filtre enduit, puis par la séparation immunomagnétique de la solution de lavage de ce filtre

(Pavli *et al.*, 2016). Dans le cas des fèces, il existe beaucoup de protocoles. Classiquement, l'isolation des oocystes du reste des matières fécales est réalisée par dilution dans du formalin (solution de formaldéhyde et de méthanol) suivie d'une filtration à travers des gazes humides, puis par une succession d'étapes de suspension du filtrat dans des solutions (comme la solution de formalin-éther) permettant de séparer les débris et les oocystes lors de la centrifugation. La phase contenant les oocystes est ensuite utilisée et peut également être soumise à séparation immunomagnétique (Lora-Suarez *et al.*, 2016; Salleh *et al.*, 2014).

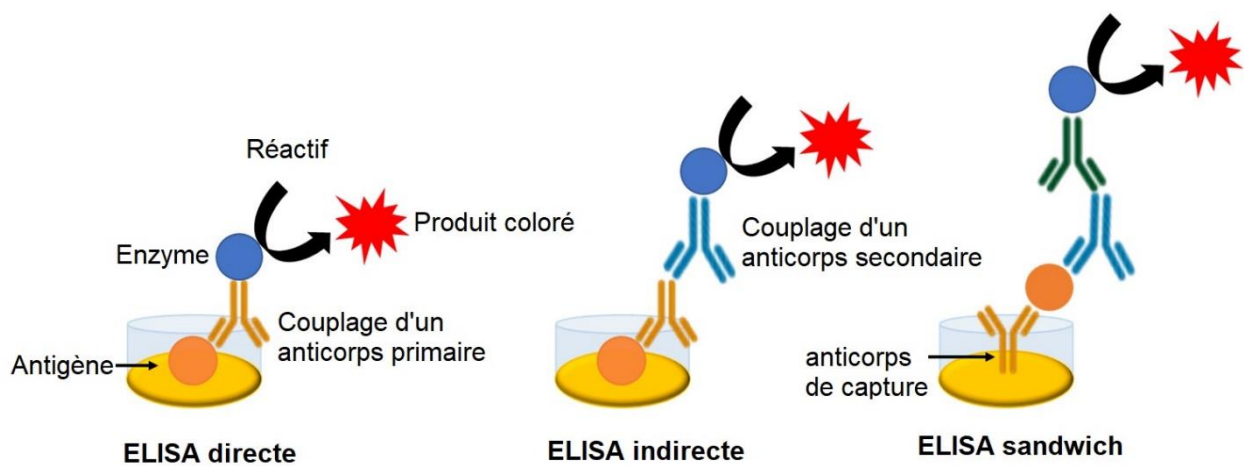
Après cette phase d'isolation des oocystes, ils sont soumis à une coloration immunofluorescente. La technique consiste à marquer les oocystes par un anticorps (dirigé contre une molécule de la paroi de l'oocyste) conjugué avec l'isothiocyanate de fluorescéine. L'oocyste est ensuite visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence (Luka *et al.*, 2022). Les techniques de coloration nécessitent toutefois un opérateur qualifié, du matériel souvent coûteux (Chalmers et Katzer, 2013).

Figure 5 : Méthodes de détection des oocystes de *Cryptosporidium parvum* (a) Microscopie optique (montage humide), (b) coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, (c) coloration à l'auramine-phénol ; (d) immunofluorescence directe (isothiocyanate de fluorescéine sur la paroi) et coloration au diamidino-phénylindole (DAPI) de l'ADN ; (e) identique à (d) avec modification informatique de la couleur d'après Crestia *et al.* (2022)



Il existe aussi des méthodes de détection antigénique ou immunoenzymatique (EIA), comme ELISA ou l'immunochromatographie, qui sont basées sur la détection d'antigène de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* sp.. Ces méthodes disposent d'une meilleure sensibilité, variant entre 98 % et 99 % (Garcia et Shimizu, 1997 ; Youn *et al.*, 2009). La méthode ELISA directe, consiste à utiliser un anticorps de la paroi de l'oocyste, couplé directement à une enzyme ou à une molécule fluorescente, qui devient visible au microscope optique ou à fluorescence. La méthode ELISA indirecte utilise un anticorps primaire non couplé, qui se fixe à la paroi de l'oocyste. Ensuite, il est rajouté un fluorochrome ou une enzyme couplé à un anticorps dirigé contre l'anticorps primaire qui permet alors la détection du kyste. Enfin, la méthode ELISA sandwich ajoute une étape initiale à l'ELISA indirecte : celle de fixation sur une plaque des antigènes de l'oocystes par un anticorps de capture (Luka *et al.*, 2022). Ces méthodes sont illustrées dans la Figure 6.

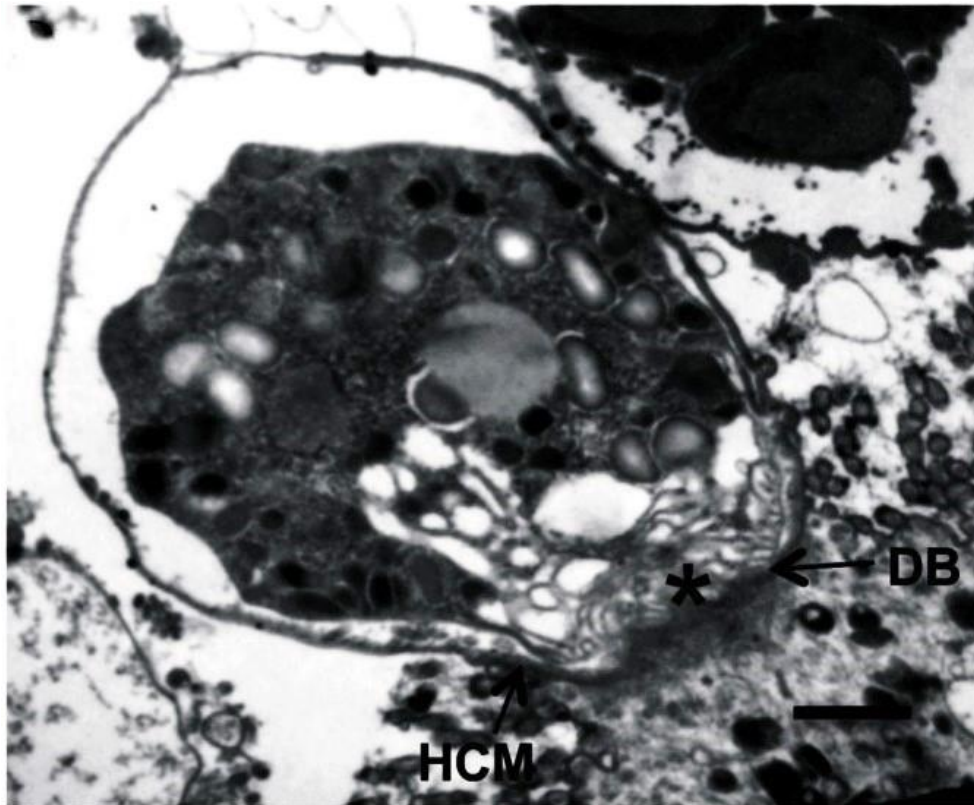
Figure 6 : Trois méthodes de détection par la technique ELISA des oocystes de *Cryptosporidium* sp. d'après Luka *et al.* (2022)



La technique de détection PCR est une technique de détection moléculaire. Elle permet une détection à la fois sensible et spécifique de *Cryptosporidium* sp. (Chalmers et Katzer, 2013), à l'aide des marqueurs suivants : le gène de l'ARN 18S, le gène de la glycoprotéine 60 (Xiao, 2010) ou le gène COWP. La technique de PCR consiste en l'ouverture des oocystes pour avoir accès à l'ADN, un mélange avec une préparation de PCR afin de fragmenter l'ADN, suivi d'une amplification des fragments puis du marquage et de la détection de ces fragments. La technique de PCR quantitative (après extraction d'ADN) permet de quantifier un nombre d'oocystes, dans des échantillons de fèces ou d'eau par exemple (Luka *et al.*, 2022).

Enfin, il existe des techniques moins utilisées de mise en évidence de *Cryptosporidium* sp., comme la microscopie électronique (Bones *et al.*, 2019), la cytométrie en flux (Adeyemo *et al.*, 2018), ou encore l'étude des oocystes par microscopie à force atomique (AFM) (Figure 7) (Miller *et al.*, 2018).

Figure 7 : Micrographie électronique à transmission de *Cryptosporidium parvum* à l'intérieur d'une vacuole parasitophore d'une cellule intestinale de souris. Un organe nutritif (*) est adhérent à la cellule hôte (HCM) au niveau d'une bande dense (DB). Échelle = 0,4 µm, d'après Benamrouz *et al.* (2012)



Des techniques sont en cours de recherche, comme la nanotechnologie (utilisation de nanostructure de semiconducteurs pour se fixer sur les oocytes), ou les biosenseurs avec exploitation informatique du signal de détection des oocystes (changement du signal lors de la présence des oocystes). Le signal pouvant être de différente nature, la capacité électrique, le potentiel électrique, ou un signal lumineux (lors de la détection colorimétrique, ou à l'aide d'une fibre optique, ou par résonance des plasmons de surface). Ces techniques sont encore lacunaires mais seront sans doute amenées à être développées à l'avenir (Luka *et al.*, 2022).

Le Tableau 2 présente les principaux tests diagnostic pour détecter *Cryptosporidium* sp. chez l'Homme en fonction de l'échantillon, les méthodes de détection utilisées pour les animaux étant principalement réalisées sur matières fécales.

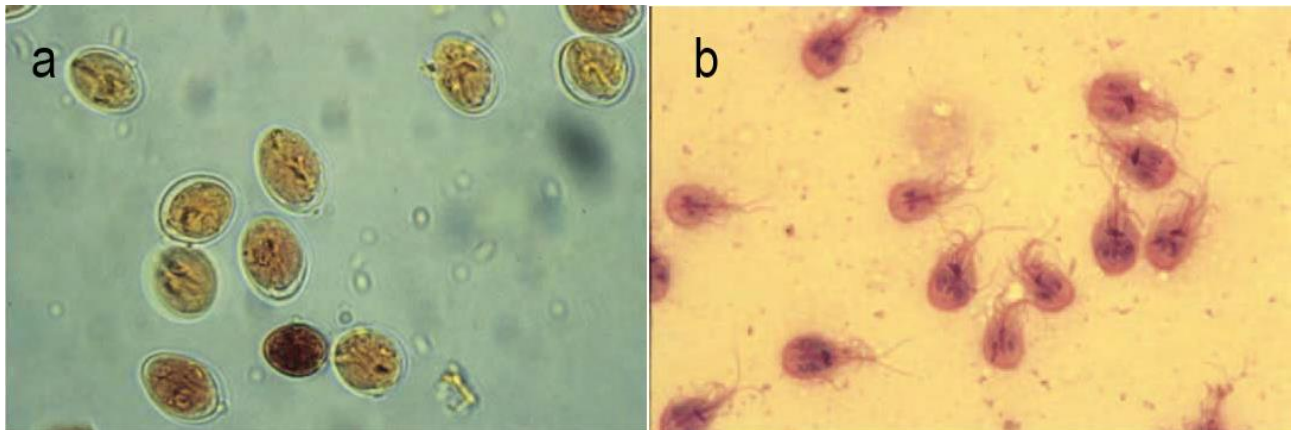
Tableau 2 : Principaux tests de diagnostic pour *Cryptosporidium* sp. chez l'Homme et les animaux en fonction de l'échantillon et de la méthode de détection (adapté d'après Chalmers et Katzer, 2013) :

Echantillon type	Méthode de récolte	Etat du patient	Tests Standards
Détection directe			
Fèces (ou pour animal mort, contenu intestinal)	Pour un élevage, collecter les fèces sur un nombre représentatif d'animaux. Répéter la récolte si <i>Cryptosporidium</i> sp. est suspecté car l'excrétion peut être intermittente. Nécessité de 2 à 3 récoltes négatives pour annoncer la fin de l'infection.	Patient avec diarrhée, pouvant correspondre aux facteurs de risque	Sur fèces fraîches ou congelées : coloration directe, coloration acido-résistante sur frottis, immunofluorescence ou immunoenzymologie (EIA), PCR en temps réel. Sur fèces préservée par des techniques telles que 10 % formalin, merthiolate-iodine-formaldéhyde, sodium-acetate-acétique acide -formalin, alcool polyvinylique : kit d'immunoenzymologie, coloration à l'acide-rapide, immunofluorescence.
Frottis intestinal	Endoscopie	Patient immunodéprimé avec des symptômes gastro-intestinaux persistants	Immunofluorescence sur les oocystes, ou extraction d'ADN et PCR.
Biopsie intestinale (possiblement <i>post-mortem</i>)	Endoscopie, laparotomie	Identique au frottis intestinal.	Coloration histologique à l'hématoxyline éosine safran (HES) pour mettre en évidence les stades endogènes de <i>Cryptosporidium</i> sp. ou PCR.
Biopsie trachéale (post-mortem)	Endoscopie ou trachéotomie	Oiseau présentant des signes respiratoires relatifs à la cryptosporidiose respiratoire	PCR
Bile	Endoscopie	Patient immunodéprimé présentant des symptômes de cholangite avec un test fécal négatif pour <i>Cryptosporidium</i> sp.	Immunofluorescence sur frottis biliaire ou PCR.
Biopsie de foie	Laparotomie	Patient immunodéprimé présentant des symptômes de maladie hépatique	Coloration hématoxyline éosine safran (HES) pour mettre en évidence les stades endogènes de <i>Cryptosporidium</i> ou PCR.
Lavage broncho-alvéolaire, lavage sinusal	Injection puis récupération d'un liquide physiologique dans les cavités	Patient immunodéprimé présentant une sinusite idiopathique	Immunofluorescence sur frottis ou PCR.

Echantillon type	Méthode de récolte	Etat du patient	Tests Standards
Détection indirecte			
Sérum	Prise de sang	Mesure de la séroconversion dans des populations larges soumises à une analyse épidémiologique	Western blot ou immunoenzymologie (EIA) ou test immunologique impliquant des protéines recombinantes pour la détection des IgG, IgM ou IgA de <i>Cryptosporidium sp.</i>
Fluide oral	Ecouvillon salivaire	Identique au sérum	Immunoenzymologie ou test immunologique impliquant des protéines recombinante pour la détection des IgG ou IgA de <i>Cryptosporidium sp.</i>
Fèces	Collecte sans contamination par l'environnement	Chez des animaux souffrant d'une infection active	EIA pour la détection de IgA spécifique à <i>Cryptosporidium sp.</i>

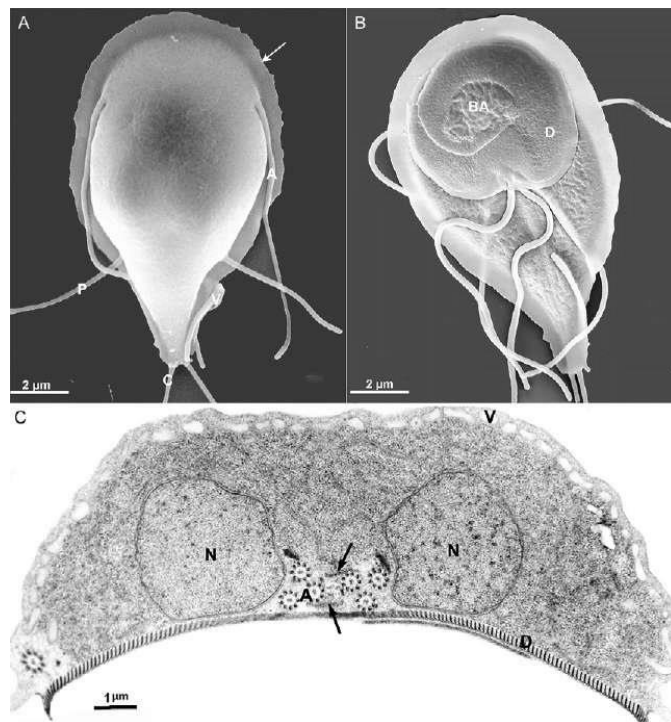
La détection de *Giardia* sp. peut se faire au microscope optique, sur une préparation humide de selles fraîches pour détecter les trophozoïtes et les kystes ou sur une préparation fixée. Les kystes peuvent être colorés par la contre-coloration des techniques de Ziehl-Neelsen ou de Kinyoun modifiées, mais aussi par des colorations plus simples, comme l'iode (Figure 8), le fer-hématoxyline, Giemsa, ou le trichrome (Adam, 2021; Adeyemo *et al.*, 2018).

Figure 8 : (a) Kystes de *Giardia* sp., coloration à l'iode (lugol), MO, X1000 et (b) trophozoïtes de *Giardia* sp., coloration Giemsa, MO, X630 d'après Favennec (2012)



Des microscopes plus récents comme le microscope à contraste interférentiel ou le microscope électronique (Figure 9) sont surtout utilisés pour l'étude de la biologie de *Giardia* sp., mais permettent aussi sa détection (Dixon, 2021).

Figure 9 : Trophozoïte de *Giardia duodenalis* au microscope électronique à balayage (A : face dorsale, B : face ventrale) et à transmission (C : Coupe transversale de la région antérieure). A : flagelle antérieur, P : flagelle postéro-latérale, V : flagelle ventral, C : flagelle caudal, D : disque ventral, N : noyaux, V : vésicules périphériques, flèches : axonèmes flagellaires, AB : zone dénudée, d'après Allain and Buret (2019)



Les kystes peuvent également être visibles après coloration immunofluorescente. Bien que cette méthode soit économique et rapide, elle manque de sensibilité à cause de l'excrétion intermittente des kystes et du faible nombre de kystes excrétés, ce qui est problématique car certains échantillons pourraient être infectieux (en effet, dix kystes sont suffisants pour causer une infection) et ne pas être détectés (Ryan *et al.*, 2019).

La détection des *Giardia* sp. a été améliorée par l'utilisation de techniques de concentration et de séparation des débris. Ils peuvent être concentrés par flottaison (au sulfate de zinc), par l'éther de formol ou éther-formalin (solution aqueuse saturée en formaldéhyde) (Adeyemo *et al.*, 2018). Les kystes peuvent être séparés par la technique de séparation immunomagnétique mais son coût élevé ne permet pas sa généralisation (Ryan *et al.*, 2019).

L'immunoenzymologie (EIA), ELISA ou chromatographie, est aussi utilisée pour détecter la présence des kystes de *Giardia* sp.. Sa spécificité est réduite à cause de réactions croisées (avec d'autres anticorps, non identifiés) et la sensibilité peut être très basse, jusqu'à 44,4 % (Ryan *et al.*, 2019), mais elle est considérée comme une bonne alternative à la microscopie. La majorité des tests rapides découlent de l'immunoenzymologie. Leur facilité d'utilisation et l'obtention rapide de résultat en font des tests précieux en clinique. Comme exemples, le test rapide SNAP© du laboratoire IDEXX permet la détection d'un antigène (non révélé par son fabriquant) spécifique de *Giardia duodenalis* présent dans des selles, et le test ColorPAC *Giardia*/Cryptosporidium issu du laboratoire Becton Dickinson, cible l'antigène CWP1 de *Giardia duodenalis* en douze minutes (Adam, 2021; Garcia et Shimizu, 1997).

Les techniques de détection des acides nucléiques peuvent être utilisées pour détecter les *Giardia* sp., comme la technique d'hybridation *in situ* (FISH), la PCR et la qPCR. L'hybridation *in situ* est basée sur l'hybridation entre un marqueur fluorescent à une région spécifique de l'ADN ou de l'ARN de *Giardia* sp., et permet notamment de détecter les parasites directement au sein des cellules de l'hôte (Ryan *et al.*, 2019). Concernant la PCR, les loci utilisés sont les gènes de la glutamate deshydrogénase (*gdh*), de l'isomérase triose phosphate (*tp*) et de la bêta-giardine (*bg*), l'espacement interne transcrit (ITS1 et ITS2) et l'ADN de la sous unité ribosomale (ssU-rRNA) (Adeyemo *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2019).

Enfin, des techniques, moins utilisées en recherche comme la cytométrie de flux (technique basée sur l'exploitation des caractéristiques morphologiques des cellules soumises à un laser, qui permet également de détecter les kystes de *Giardia* sp. lorsqu'ils sont immunofluorescents). Cette technique permet d'analyser de nombreux échantillons rapidement, et sa sensibilité est reconnue dix fois supérieure à l'immunofluorescence conventionnelle (Adeyemo *et al.*, 2018). Des techniques de culture sont aussi utilisées pour détecter *Giardia* sp..

Le Tableau 3 présente les principaux tests diagnostic pour détecter *Giardia* sp. chez l'Homme en fonction de l'échantillon. Les méthodes de détection utilisées pour les animaux sont principalement réalisées sur matières fécales.

Tableau 3 : Principaux test de diagnostic pour *Giardia* sp. chez l'Homme en fonction de l'échantillon et de la méthode de détection (adapté d'après Adeyemo *et al.*, 2018 ; Hooshyar *et al.*, 2019) :

Echantillon type	Méthode de récolte	Etat du patient	Tests Standards
Détection directe			
Fèces	Pour un élevage, collecter un nombre représentatif d'animaux. Répéter la récolte si <i>Giardia</i> sp. est suspecté car l'excrétion peut être intermittente.	Patient avec diarrhée, pouvant correspondre aux facteurs de risque	Sur fèces frais : microscopie sur suspension fécale dans solution saline ou fixé par de l'acétate de sodium-acide acétique-formaline (visualisation des kystes et des trophozoïtes), coloration directe au lugol, bleu de méthylène, coloration de May-Grünwald et Giemsa, noir de chlorasol, trichrome, coloration immunofluorescente après fixation. Recherche d'antigène par kit d'immunoenzymologie (EIA). Tests rapides Immunofluorescence directe. PCR en temps réel.
Contenu duodeno-jéjunal	Endoscopie ou par Entero-Test (utilisation d'un fil de nylon)		Fixation sur lame et coloration
Détection indirecte			
Sérum Salive	Prise de sang Ecouvillon buccal	Signes cliniques compatibles	Test antigénique pour le sérum, mais sensibilité et spécificité faibles (Adam, 2021) Suivi de la production d'immunoglobuline A dans la salive et le sérum

1.3.3. Méthodes de contrôle et de prévention

1.3.3.1. Contrôle et prévention de *Cryptosporidium* sp.

La prévention de la contamination par *Cryptosporidium* sp. chez l'être humain comprend une bonne hygiène personnelle, le lavage des mains avant préparation et consommation de la nourriture, et après contact avec des fèces (toilettes, contact avec des individus diarrhéiques). Les aliments et boissons doivent être lavés, cuits ou bouillis avant ingestion. Les patients atteints de diarrhée doivent être avertis de ne pas se baigner dans une piscine publique ou rivière fréquentée afin de prévenir la contamination du milieu (Pumipuntu et Piratae, 2018).

Dans les élevages, les mesures préventives diminuant la transmission de *Cryptosporidium* sp. sont la baisse de la densité des animaux, la séparation des individus sensibles (comme les jeunes animaux ou les malades, dans des caisses à caillebotis en béton plus faciles à désinfecter (Adkins, 2022)), la détection rapide des individus malades, et la désinfection de leur litière à l'aide de chaux et d'eau bouillante (Matsuura *et al.*, 2017). Les oocystes infectants de *C. parvum* sont très résistants à la plupart des méthodes de désinfection usuelles. Cependant, les processus de stérilisation à la vapeur, au peroxyde d'hydrogène à 6 % ou 7,5 % ou à l'oxyde d'éthylène permettent d'inactiver au moins 3 logs de kystes de *C. parvum* (Barbee *et al.*, 1999), d'autres procédés à l'aide de dioxyde de chlore, d'ozone, et de lumière UV sont efficaces pour la désinfection de l'eau mais ne font pas partie des procédés usuels (Pumipuntu et Piratae, 2018).

Le traitement symptomatique de la cryptosporidiose comprend la réhydratation, des anti-diarrhéiques, ainsi que d'éventuels anti-inflammatoires (Adkins, 2022; Thompson *et al.*, 2005).

Le traitement de la cryptosporidiose est extrêmement difficile. Chez les veaux, un traitement spécifique consiste en l'administration de lactate d'halofuginone à 100 µg/kg/j, à utiliser dans les 24 à 48h après l'apparition de la diarrhée (Klein, 2008). Du sulfate de paromomycine est également utilisé contre la cryptosporidiose chez les veaux, à la dose de 100 mg/kg/j (Grinberg *et al.*, 2002). Son efficacité a été également démontrée chez les agneaux (Viu *et al.*, 2000), mais est fortement controversée en médecine humaine. Il n'est pas plus efficace qu'un placebo chez des patients souffrant du SIDA (Hewitt *et al.*, 2000). Il existe également des bioadhésifs à base de chitosan permettant d'empêcher la fixation des oocystes dans l'intestin grêle dont l'efficacité a été prouvée sur des souris et sur des cellules humaines *in vitro* (Mammeri *et al.*, 2018).

Chez l'Homme, le nitazoxanide permet la résolution de la diarrhée chez la majorité des patients au bout de 3 à 4 jours. Ce dérivé du nitrothiazolyl-salicylamide réduit également la durée de la diarrhée et l'excrétion d'oocystes chez des patients non immunodéprimés (Rossignol *et al.*, 2001), c'est par ailleurs la seule molécule ayant été approuvée par la US Food and Drug Administration (FDA).

De nouvelles molécules, dérivées de quinoléine-8-ol, à base d'allopurinol et de la 2,4-diaminoquinazoline ont une activité inhibitrice contre l'infection à *Cryptosporidium* sp. (Bessoff *et al.*, 2014), de même que le clofazimine, et pourraient devenir des traitements de référence contre la cryptosporidiose (Love *et al.*, 2017), tant l'efficacité du nitazoxanide est controversée sur les individus immunodéprimés. En effet, il est tenu responsable d'augmenter les taux de mortalité dans certaines études, ou considéré comme inefficace, au même titre que la paromomycine, l'azithromycine, la rifamycine et les protéases inhibitrices impliqués dans le traitement contre le VIH (O'Leary *et al.*, 2021).

Des inhibiteurs spécifiques de l'inosine 5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH) de *Cryptosporidium* sp. semblent un traitement prometteur. En effet, ce parasite dépend entièrement de cette enzyme pour synthétiser la guanine, un des principaux nucléotides cellulaires (Kirubakaran *et al.*, 2012).

Certains traitements incluent des inhibiteurs des coenzyme-A synthétases, enzymes nécessaires pour le métabolisme des lipides, comme la triacsine C chez la souris (Guo *et al.*, 2014). D'autres traitements, déjà préexistants, ont montré une efficacité contre *Cryptosporidium* sp., en particulier l'itavastatine, un inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, mais *in vitro* seulement (Bessoff *et al.*, 2013).

Enfin, le développement de vaccins est fortement limité par une connaissance lacunaire de la réponse immunitaire aux *Cryptosporidium* sp., bien que la possibilité de développement d'un vaccin soit réelle. En effet, il existe une réponse spécifique qui conduit à la nécessité d'une dose infectante plus forte lors de réinfection, surtout par la même espèce de *Cryptosporidium* sp. (Dupont et Okhuysen, 1995), et plus récemment, dans certaines régions très touchées par la cryptosporidiose, il a été démontré que les jeunes enfants sont plus infectés que les enfants plus âgés et dans une autre étude, que des adultes préalablement soumis à *Cryptosporidium* sp. y sont moins sensibles lors de leur seconde exposition. Cela soutient l'hypothèse d'un développement d'une immunité contre *Cryptosporidium* sp., mais qui n'est pas une immunité totale (Guérin et Striepen, 2020). Plusieurs antigènes destinés à augmenter le taux d'immunoglobuline G ont été développés comme candidats pour les vaccins. Les plus étudiés sont *gp15*, *cp15* et *cp23* (Ryan *et al.*, 2016). O'Leary *et al.* (2021) conservent des espoirs quant à la découverte d'un vaccin ou d'un traitement grâce à la technique de modification génétique CRISP-Cas9.

1.3.3.2. Contrôle et prévention de *Giardia* sp.

La prévention est un élément-clé du contrôle des giardioses, notamment vis-à-vis de l'eau potable : boire uniquement de l'eau de bouteille dans les pays à haute prévalence, faire bouillir l'eau, la filtrer ou la purifier à l'aide d'iode. D'autres mesures d'hygiène sont recommandées, telles que le lavage fréquent des mains (Kucik *et al.*, 2004).

Dans les élevages contaminés, il est important de nettoyer régulièrement et désinfecter les cases, d'enlever les fèces, d'isoler les individus malades et de vérifier la prise colostrale chez les veaux. Chez les carnivores domestiques, il importe de nettoyer l'animal, restreindre l'accès à l'eau non traitée, ainsi qu'aux zones contaminées (Dixon, 2021).

Les infections à *Giardia* sp. provoquent des symptômes chez certains hôtes, mais pas chez d'autres. Ceci peut être expliqué par la variabilité de la virulence entre les souches, bien qu'il n'existe pas de corrélation claire à ce jour entre certains assemblages et la manifestation clinique engendrée. La variabilité symptomatologique s'explique également par l'état nutritionnel de l'hôte, les coinfections avec d'autres agents pathogènes entériques, les réponses immunitaires de l'hôte et le microbiote intestinal (Dixon, 2021). Il a été montré que la présence d'un microbiote intestinal permet de réduire l'infection par *Giardia* sp., que l'infection est plus importante après l'ingestion d'antibiotiques (connus pour engendrer un changement de flore intestinale) et que les personnes symptomatiques ont plus souvent un profil dysbiotique que les saines (Adam, 2021).

En cas de détection de *Giardia* sp. chez un être vivant, il convient d'analyser la présence de signes cliniques ou non, ainsi que la contamination du milieu. Adam (2021) recommande de traiter les individus symptomatiques, et ceux asymptomatiques vivant en milieu sain pour éviter qu'ils

contaminent leur environnement, mais aucune donnée ne confirme ces dires pour l'instant. À l'inverse, il ne recommande pas de traiter un individu asymptomatique en milieu contaminé en raison des potentielles acquisitions de résistance et d'altération du microbiote chez les individus traités et non symptomatiques.

De nombreux traitements existent contre la giardiose. Le traitement symptomatique consiste à maintenir une balance électrolytique équilibrée et une bonne hydratation (Dixon, 2021).

Les traitements actuels humains incluent du nitazoxanide, antibiotique large spectre, et des dérivés du 5-nitroimidazole tels que le métronidazole, le tinidazole, l'ornidazole et le secnidazole. Chez l'humain, le métronidazole peut causer des dysbioses microbiennes et entraîner un risque de colonisation par d'autres agents pathogènes. De multiples résistances ont été rapportées aux dérivés du 5-nitroimidazole, ceci étant de plus en plus fréquent (Einarsson *et al.*, 2016; Riches *et al.*, 2020). Cependant, il est difficile de démontrer *in vitro* la résistance de certains *Giardia* sp. aux traitements car leur mise en culture est complexe. Aussi, il est ardu de faire la différence entre une véritable résistance et un cas réfractaire isolé (Adam, 2021). Malgré cela, des recombinaisons génétiques ont été mises en évidence, expliquant la résistance de certains *Giardia* sp. au métronidazole (Feng et Xiao, 2011).

D'autres médicaments tels que l'albendazole et le mébendazole (appartenant à la famille des benzimidazoles), ou la paromomycine ont été utilisés pour traiter la giardiose. Le mébendazole a une faible efficacité, et l'albendazole est embryotoxique bien que très efficace (Adam, 2021). Des probiotiques ont récemment démontré une activité létale sur les trophozoïtes et ont réduit la charge parasitaire, l'excrétion de kystes et la durée d'infection (Dixon, 2021; Riches *et al.*, 2020).

D'autres traitements ont prouvé une efficacité mais ne sont plus utilisés ou sont en cours de développement chez l'espèce humaine, tels que la furazolidone, la quinacrine, la chloroquine, la bacitracine, ou encore l'auranofine, l'orlistat, l'oméprazole et le NBDHEX (6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol) (Riches *et al.*, 2020). Des recombinaisons génétiques entraînant des résistances ont aussi été démontrées chez *Giardia* sp. concernant la furazolidone (Feng et Xiao, 2011).

En cas d'échec thérapeutique, il est possible d'utiliser une molécule de seconde intention, comme la quinacrine, très efficace mais ayant de très forts effets indésirables et difficile d'accès, ou la combinaison de molécules. Ainsi, l'imidazole associé à la quinacrine ou le nitroimidazole associé à l'albendazole ont été démontrés comme efficaces en cas d'échec de traitement initial.

Le traitement des ruminants se fait par des médicaments anthelminthiques, comme l'albendazole et le fenbendazole. Chez les carnivores domestiques, le fenbendazole et le métronidazole sont recommandés pour le traitement de la giardiose. Certaines molécules utilisées chez l'espèce humaine pour traiter la giardiose sont reconnues comme efficaces chez les chiens (Dixon, 2021).

Les *Giardia* sp. possèdent un mécanisme d'échappement antigénique, permettant aux trophozoïtes d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Aucun vaccin humain contre la giardiose n'est de ce fait disponible. Des vaccins ont été développés chez le Chat et le Chien aux États-Unis et sont composés de multiples protéines de surface de *Giardia duodenalis*, protéines extrêmement variables, mais semblent être efficaces (Adam, 2021; Dixon, 2021; Serradell *et al.*, 2016).

2. Rôle de la faune sauvage comme réservoir

Comme vu précédemment, de très nombreuses espèces de *Cryptosporidium* sp. ont été identifiées dans la faune sauvage, bien que la plupart ne semblent pas présenter de risque pour la santé publique. Cependant, certaines de ces espèces ont également été retrouvées chez l'espèce humaine ; la difficulté est alors d'identifier la source des épidémies, car l'Homme peut être lui-même réservoir.

De même, il existe peu d'informations disponibles sur la prévalence de *Giardia* sp. au sein de la faune sauvage et sur leur rôle de réservoir.

2.1. Problématique dans le monde

Le Tableau 4 répertorie la liste des espèces de *Cryptosporidium* sp. ayant contaminé déjà un humain et ayant été identifiées chez au moins une espèce de la faune sauvage.

Dans une étude menée dans deux centres de soins de la faune sauvage en Californie, Siembieda *et al.* (2011) ont mis en évidence *Cryptosporidium* sp. chez moins de 1 % des animaux du centre, mais sur 10,7 % (3/28) des mammifères, comprenant un lynx roux, un rongeur de la famille des Géomyidés et un raton-laveur.

Une épidémie survenue en centre de soin en mai 2019 aux Etats-Unis nous prouve l'importance de la surveillance clinique et des analyses complémentaires. Dans ce centre de soin de la faune sauvage, six ratons-laveurs ont présenté des signes compatibles avec une cryptosporidiose. Onze jours après la première suspicion, des soigneurs et bénévoles ont présenté à leur tour des signes compatibles avec la cryptosporidiose, quinze présentèrent de la diarrhée. Sur les quatre testés par PCR en temps réel, trois prélèvements sont revenus positifs à *Cryptosporidium* sp., et deux ont été génotypés et présentaient le même sous-type, *C. parvum* IIaA16G3R2 que les ratons laveurs (Davis *et al.*, 2022).

Tableau 4 : Listes des espèces de *Cryptosporidium* sp. retrouvées chez au moins une espèce appartenant à la faune sauvage

Espèce de <i>Cryptosporidium</i>	Espèces-hôtes (faune sauvage)	Infection humaine	Remarques	Sources
<i>C. parvum</i>	Traditionnellement considéré comme pouvant infecter tous les mammifères. Quelques exemples d'espèces sauvages présentant <i>C. parvum</i> ; Chien viverrin, Rat surmulot, Autruche d'Afrique, Furet, Raton-laveur	Très fréquente	Saisonnalité : infections humaines sont plus fréquentes au printemps, notamment en Irlande, et majoritairement en zones rurales, ce qui peut s'expliquer par la hausse des naissances des ruminants domestiques. Le sous type bovin Ila est le plus communément retrouvé chez l'humain.	(El-Alfy et Nishikawa, 2020; Feng et Xiao, 2011; Waldron <i>et al.</i> , 2011; Xiao, 2010)
<i>C. hominis</i>	Daim européen Certains espèces de singes en Afrique Marsupiaux dont le Phalanger renard, Kangourou géant, Wallabie des rochers, et le Dugong en Australie	Très fréquente, principalement le sous-type Ib.	La transmission interhumaine semble primer sur le caractère zoonotique. Prédominante par rapport à <i>C. parvum</i> dans les pays en développement, plus fréquente en automne, en zone urbaine.	(Feng et Xiao, 2011; Waldron <i>et al.</i> , 2011; Xiao, 2010; Zahedi <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. cuniculus</i>	Lapin de garenne (Angleterre et Australie) Kangourou géant en Australie	Commun	Une épidémie en Angleterre en 2008.	(Nolan <i>et al.</i> , 2013; Puleston <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. muris</i>	Sont communément admis comme hôtes possibles : Rongeurs, canidés, félidés, suidés, girafes, équidés, primates, marsupiaux, oiseaux Quelques exemples d'espèces présentant <i>C.</i>	Commun	Potentiel zoonotique confirmé expérimentalement	(Chappell <i>et al.</i> , 2015; El-Alfy et Nishikawa, 2020; Feng et Xiao, 2011; Zahedi <i>et al.</i> , 2015) ;

Espèce de <i>Cryptosporidium</i>	Espèces-hôtes (faune sauvage)	Infection humaine	Remarques	Sources
	muris : Rat surmulot, Chat féral			
<i>C. meleagridis</i>	Oiseaux principalement, mais peu spécifique Exemples : Cerf sika, Rat surmulot, Souris sylvestre, Souris à pattes blanches	Commun	Potentiel zoonotique confirmé expérimentalement.	(Chappell <i>et al.</i> , 2011; El-Alfy et Nishikawa, 2020; Feng et Xiao, 2011)
<i>C. canis</i>	Renard, Coyote	Commun		(Elwin <i>et al.</i> , 2012; Xiao et Fayer, 2008)
<i>C. felis</i>	Macaque rhésus, Chat de Pallas	Commun		(Beser <i>et al.</i> , 2015; Zahedi <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. bovis</i>	Renard, Chevreuil, Gorille des montagnes	Rare		(Zahedi <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminants sauvages : Cerf des marais, Cerf de Virginie, Cerf sika, chevreuil, Ibex de Sibérie Rongeurs : Souris sylvestre, Écureuil gris, Écureuil roux, Tamia rayé, Castor du Canada, Marmotte commune Renard	Rare	Les contaminations humaines ont eu lieu en Angleterre, Slovénie, Etats Unis, Canada, Espagne, Nouvelle Zélande et Niger.	(El-Alfy et Nishikawa, 2020; Li <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. erinacei</i>	Hérisson d'Europe	Rare	Le Hérisson pygmée d'Afrique est un hôte expérimental.	(Kvac <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. tyzerri</i>	Rongeurs (Souris grise, Rat surmulot, Mulot à collier, Campagnol des champs) et félins (Léopard, Lynx roux)	Rare		(Zahedi <i>et al.</i> , 2015 ; Rašková <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. scrofarum</i>	Sanglier, rongeurs	Rare		(El-Alfy et Nishikawa, 2020; Zahedi <i>et al.</i> , 2015)

Espèce de <i>Cryptosporidium</i>	Espèces-hôtes (faune sauvage)	Infection humaine	Remarques	Sources
<i>C. suis</i>	Sanglier, Rat surmulot, Chimpanzé commun	Rare		(El-Alfy et Nishikawa, 2020; Zahedi <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. andersoni</i>	Bison d'Europe, Chameau de Bactriane, Hamster de Campbell, Hamster doré, Panda géant...	Rare	Réservoir mineur	(El-Alfy et Nishikawa, 2020; Waldron <i>et al.</i> , 2011; Zahedi <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. fayeri</i>	Kangourou gris et géant Lapin de Garenne	Rare	Les kangourous vivent sur les zones de captages d'eau potable et sont infectés, les contaminations par <i>C. fayeri</i> en Australie sont très probablement zoonotiques.	(Braima <i>et al.</i> , 2021; Waldron <i>et al.</i> , 2011)
<i>Chipmunk genotype I</i>	Écureuil gris, Souris sylvestre, Tamia rayé	Rare		(Zahedi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Horse genotype</i>	Cheval de Przewalski	Rare		(Zahedi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Skunk genotype</i>	Raton laveur, Écureuil gris, Loutre de rivière, Mouffette rayée, Éléphant de mer du sud	Rare		(Siembieda <i>et al.</i> , 2011; Zahedi <i>et al.</i> , 2015)

Peu d'informations sont disponibles sur la prévalence de *Giardia duodenalis* dans la faune sauvage. *G. duodenalis* est la seule espèce détectée chez l'humain et capable d'induire des signes cliniques. Les assemblages A et B sont considérés comme zoonotiques car ces assemblages sont peu spécifiques, et peuvent être retrouvés chez les animaux domestiques et sauvages. L'assemblage A peut être divisé en quatre sous-assemblages : AI, AII, AIII, AIV. Les sous-assemblages AI et AII sont ceux retrouvés chez l'humain, AII étant plus fréquent chez l'humain et AI plus fréquent chez les animaux domestiques et le bétail. Dans le cas des infections humaines, l'assemblage B (58 %) prévaut sur l'assemblage A (37 %) et sur les infections mixtes dues à *Giardia* sp. dans le monde. Les assemblages C à H sont très spécifiques de leurs hôtes et ne sont pas retrouvés chez l'humain (Ryan et Cacciò, 2013).

Concernant les espèces sauvages excréant des kystes de l'assemblage A reportées en Europe, nous pouvons noter un chevreuil aux Pays-Bas, des élans et des rennes en Norvège et des daims en Italie (Xiao et Fayer, 2008). Dans le reste du monde, les espèces sauvages identifiées comme ayant excrété des kystes de l'assemblage A sont le Castor du Canada, des goélands argentés, des cacatoès à huppe jaune, de nombreux primates (entre autres le Vari roux, le Saïmiri de Bolivie...), des marsupiaux (kangourou roux, wallaby bicolore ...), des rongeurs (Chinchilla, Rat musqué, Mara de Patagonie...), et le Coati à nez blanc, le Pécari à collier, le Caribou du Canada, l'Élan, le Lynx d'Europe, le Léopard des Neiges, le Guépard, et divers canidés (Lycaon, Coyote, Renard, Loup, Loup à crinière, Chacal commun) (Ryan et Cacciò, 2013). Dans une étude menée dans deux centres de soins de la faune sauvage en Californie, (Siembieda *et al.*, 2011) ont mis en évidence *Giardia duodenalis* chez 4,6 % des animaux testés sur 328 animaux (comprenant moins de 9 % de mammifères). Seuls deux étaient des mammifères, et un seul échantillon provenant d'un lynx roux a été génotypé et correspondait à l'assemblage A.

Les espèces sauvages identifiées comme ayant excrété des kystes de l'assemblage B sont les macaques japonais (Xiao et Fayer, 2008), le Rourmilier géant, Castor du Canada, Eider à duvet, Goélands argenté, Cacatoès à huppe jaune, Ours malais, et de nombreux primates (entre autres le Vari roux, le Saïmiri de Bolivie...), marsupiaux (Kangourou roux et Kangourou gris, Wallaby bicolore ...), rongeurs (Chinchillas, Rat musqué, Mara de Patagonie...) et Canidés (Lycaon, Coyote, Renard, Loup, Loup à crinière, Chacal commun) (Ryan et Cacciò, 2013).

Les assemblages A et B de *G. duodenalis* se retrouvent aussi chez les chats féraux, Guadano Procesi *et al.* (2022) a conclu à une prévalence de 35,3 % chez 133 chats en Italie, prévalence jugée comme haute par rapport aux autres études d'Europe sur le même sujet.

2.2. Le Hérisson d'Europe (*Erinaceus europeaeus*) comme réservoir des cryptosporidies et des *Giardia* sp.

La première description d'une cryptosporidiose chez un hérisson date de 2002 au Danemark (Enemark *et al.*, 2002). Plus récemment, des cryptosporidioses ont été aussi décrites en Allemagne (Dyachenko *et al.*, 2010), aux Pays-Bas (Krawczyk *et al.*, 2015), en République tchèque (Hofmannová *et al.*, 2016) et au Royaume-Uni (Sangster *et al.*, 2016).

Le Hérisson d'Europe peut être infecté par différentes espèces et types de cryptosporidies : *Cryptosporidium parvum* sous-types IIaA17G1R1 et IIcA5G3 (Krawczyk *et al.*, 2015), ainsi que IIaA17G1, IIaA19G1 and IIaA24G1 (Sangster *et al.*, 2016) ; *C. hominis* sous-type IbA10G2 (Krawczyk *et al.*, 2015) ; et *C. erinacei* (Kvac *et al.*, 2014).

Un des sous-types décrit chez le Hérisson européen a déjà été retrouvé chez un être humain, ce qui laisse supposer une origine zoonotique : *C. parvum* sous-type IlcA5G3j (Chalmers *et al.*, 2011a ; Dyachenko *et al.*, 2010).

Concernant *C. erinacei*, on dispose aujourd'hui de peu d'informations pour cette espèce auparavant considérée comme un génotype de *C. parvum*. Des études l'ont identifié chez le Hérisson d'Europe, le cheval (Laatamna *et al.*, 2013) et l'espèce humaine (identification du parasite par PCR), confirmant son potentiel zoonotique (Kvac *et al.*, 2014). Dans ce dernier cas, le malade présentait une douleur abdominale et des selles de consistance molles. L'infection était due à plusieurs parasites, et le comptage de *Cryptosporidium* sp. a estimé 30 000 oocystes par gramme de fèces.

C. erinacei ne semble pas entraîner de symptômes cliniques chez le Hérisson. Une coinfection avec *C. parvum* peut conduire à des signes cliniques tels que de la diarrhée (Kvac *et al.*, 2014). Un autre cas de cryptosporidiose chez un hérisson d'Europe datant de 2009 (Meredith et Milne, 2009), fait état d'une diarrhée hémorragique ayant nécessité l'euthanasie de l'individu, sans que l'espèce ne soit précisément identifiée.

Les études relatives à la présence de *Giardia* sp. chez le hérisson d'Europe sont rares. *Giardia duodenalis* a déjà été décrite chez cette espèce, la méthode PCR en temps réel ayant révélé une appartenance aux assemblages A ou B, tous deux associés à des infections humaines (Krawczyk *et al.*, 2015).

En ce qui concerne le traitement de la cryptosporidiose ou de la giardiose chez le Hérisson, tandis qu'aucune molécule utilisée chez des autres espèces animales contre *Cryptosporidium* sp. ne semble avoir de posologie disponible chez le Hérisson d'Europe, les médicaments efficaces contre *Giardia* dont les posologies ont été établies chez le Hérisson sont le fenbendazole, le mébendazole et le métronidazole (Helmer et Carpenter, 2017).

2.3. Gestion sanitaire dans les centres de sauvegarde de la faune sauvage

Les personnes qui touchent des animaux sauvages (en particulier les hérissons pour ce qui nous concerne), aussi bien les découvreurs que les soigneurs ou autres bénévoles des centres de sauvegarde, sont potentiellement en contact avec des zones contaminées de l'animal ou ses fèces, et pourraient ainsi contracter une zoonose, dont la cryptosporidiose ou la giardiose.

Au sein du CHUV-FS, le personnel soignant dispose de chaussures et de blouses dédiées à la zone de soins. Des gants associés à chaque cage sont à disposition pour manipuler les hérissons. Le substrat (papier journal) est changé tous les jours et jeté dans une poubelle destinée à l'incinération.

Comme l'épidémie survenue en Virginie aux États-Unis le suggère (Davis *et al.*, 2022), malgré le respect du protocole de nettoyage de la structure et des cages, la contamination du personnel soignant a quand même eu lieu, et la connaissance du parasite responsable a permis d'instaurer un protocole de désinfection au peroxyde d'hydrogène. Il importe donc d'identifier la cause en cas de diarrhée chez des juvéniles et de réaliser des examens complémentaires afin de trouver un protocole de nettoyage ciblé.

Les recommandations données par Mullineaux et Keeble (2016) sont des grands principes d'hygiène à respecter en centre de soin. Il y est notamment recommandé une isolation en quarantaine des nouveaux animaux, une manipulation de ceux-ci en tenue à usage unique et un

nettoyage aussi souvent que possible de toutes les zones de soin. Hors des salles de quarantaine, il est recommandé d'utiliser des gants en latex à usage unique pour les patients possiblement porteurs de maladies infectieuses. Le matériel en contact avec les animaux (balance, outils de soin) doit être désinfecté après chaque usage et les désinfectants doivent être adaptés aux risques de maladies et appliqués comme recommandé par le fabricant. Siembieda *et al.* (2011) ajoutent d'être particulièrement attentifs à l'hygiène, notamment dans les moments de grands afflux en centre. Nous reviendrons sur les méthodes de gestion sanitaire par la suite.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Cette étude s'est déroulée dans le cadre des soins prodigués aux Hérissons d'Europe reçus au CHUV-FS (ex-CEDAF). Celui-ci dispose d'une autorisation pour la détention et la réhabilitation de cette espèce, détenue par le capacitaire du centre. Par ailleurs, aucune autorisation supplémentaire n'a été nécessaire compte-tenu du caractère non invasif des prélèvements effectués.

L'objectif de cette étude est d'obtenir un premier état des lieux de la connaissance de la prévalence de *Cryptosporidium* sp. et *Giardia* sp. chez les hérissons d'Europe reçus au CHUV-FS, et d'en déduire des mesures de contrôle et de prévention adaptées, à la fois pour limiter la contamination entre hérissons, mais également vis-à-vis de l'espèce humaine (risque zoonotique).

1.1. Lieux de travail

1.1.1. CHUV-FS

La Clinique faune sauvage (CFS) fut créée en 1987 par Jean-François Courreau au sein du campus de l'École nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA), à Maisons-Alfort (94). Renommé Centre d'accueil de la faune sauvage (CEDAF) en 2003, le centre est soutenu pour partie depuis 2013 par l'association Faune Alfort, qui se donne pour objectif de recueillir tout type d'animal de la faune sauvage européenne nécessitant des soins, dans le but de les relâcher. Cette association cherche également à former des bénévoles à la prise en charge de ces animaux, ainsi que de sensibiliser le grand public à la fragilité de la faune sauvage.

En 2020, le CEDAF devient le Centre hospitalier universitaire vétérinaire de la faune sauvage (CHUV-FS) en étant complètement intégré à la formation des étudiants vétérinaires de l'ENVA. Cette année marque aussi la création d'un nouveau centre d'élevage des jeunes animaux à Chennevières-sur-Marne (94) et un centre de relâcher à Mandres-les-Roses (94).

L'équipe de Faune Alfort est constituée de huit administrateurs et de trois salariées (une directrice, une secrétaire et une chargée de communication). L'équipe du CHUV-FS est composée d'une vétérinaire salariée, d'un responsable de centre capacitaires, de vétérinaires bénévoles, de cinq soigneurs salariés et de plusieurs Services civiques. De nombreux bénévoles et stagiaires prennent également part toute l'année aux activités du centre (Grisot, 2021).

La prise en compte des risques zoonotiques se fait notamment par le biais de la formation de tous les acteurs du centre en contact avec la faune sauvage. Le nettoyage des mains est obligatoire avant et après la manipulation de tout animal (ou groupe d'animaux) ou de leur environnement de soin (cage, carton, etc.) ; des gants jetables sont à disposition pour l'ensemble des soins réalisés. Les gants de contention sont aussi nettoyés et désinfectés régulièrement, *a minima* entre chaque animal. Plus précisément, il est nécessaire d'être vacciné contre la rage et formé à la contention pour manipuler des animaux possiblement excréteurs, il est demandé de porter des gants à usage unique lors de manipulation d'animaux teigneux et lors de manipulation de renards en raison de l'échinococcose.

Sur les 5898 animaux accueillis au centre en 2019, 563 étaient des hérissons d'Europe, soit 9,5 %. En 2020, sur les 4690 animaux accueillis, 540 étaient des hérissons d'Europe, soit 11,5 %. La Figure 10 présente le nombre d'animaux selon l'espèce arrivés au centre en 2019 et en 2020, le

Hérisson d'Europe y occupe ces deux années une place importante en nombre d'arrivées. La Figure 11 présente l'évolution du nombre d'arrivées de hérissons au sein du centre, qui tend plutôt à augmenter au même titre que le nombre total d'arrivées.

Figure 10 : Nombre d'animaux des cinq espèces majoritaires arrivés au CHUV-FS en 2019 et 2020

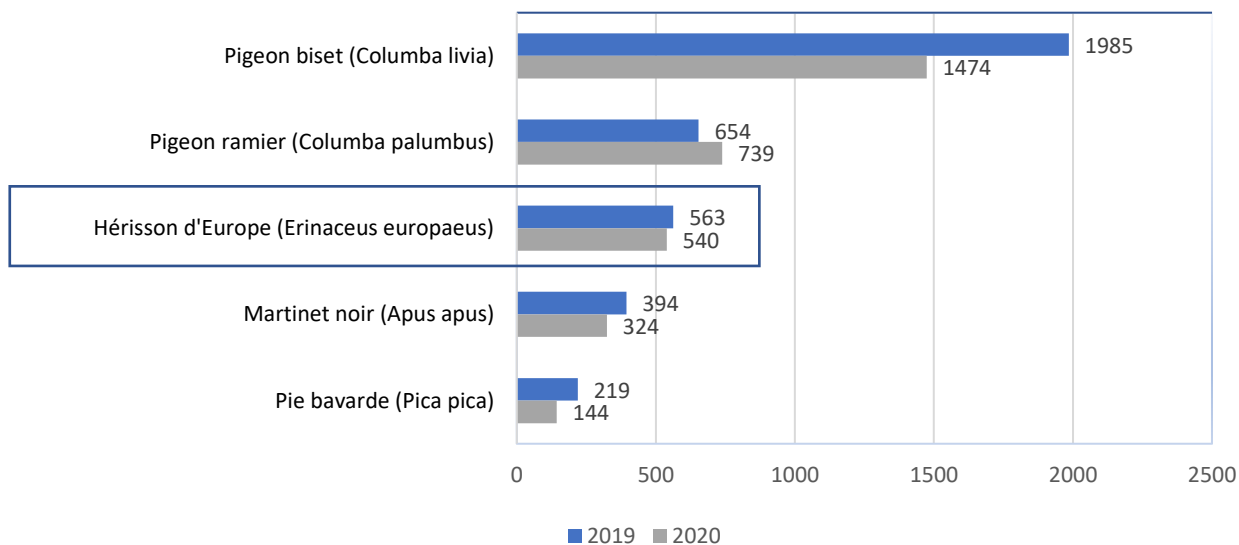
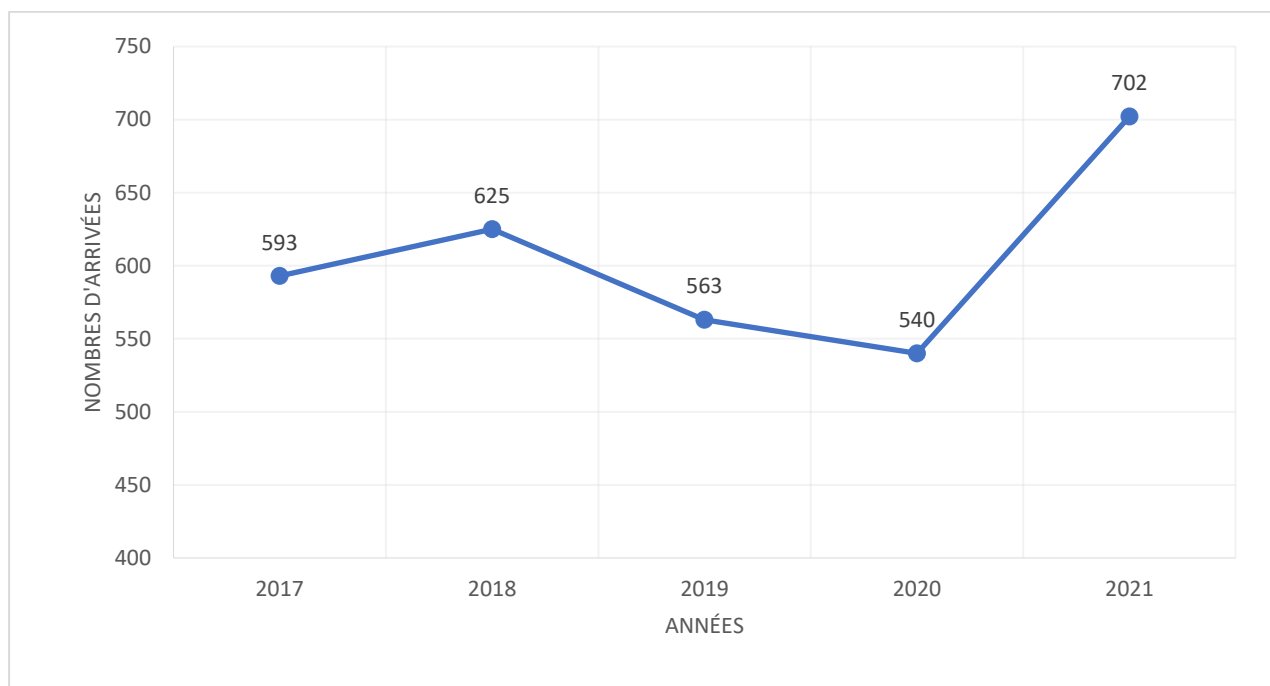


Figure 11 : Évolution annuelle du nombre d'arrivées de hérissons d'Europe au CHUV-FS



1.1.2. Biopôle – Laboratoire de Parasitologie

Le Biopôle est une plateforme de diagnostic clinique situé sur le campus de l'ENVA. Il comprend un laboratoire d'analyse dans les secteurs suivant : bactériologie, histopathologie, biochimie, cytologie, immunologie, mycologie, parasitologie et virologie. Le Biopôle réalise aussi des

autopsies animales. L'équipe technique du Biopôle est constituée d'enseignants-chercheurs, d'ingénieurs et de techniciens.

Les analyses réalisées dans le cadre de cette thèse ont été menées au laboratoire de parasitologie du Biopôle, qui contient le matériel nécessaire pour réaliser les dilutions coprologiques, la filtration et la coloration des lames.

1.1.3. ANSES – équipe BIPAR

L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) est un établissement public placé sous la tutelle des ministères chargés de la Santé, de l'Agriculture, de l'Environnement, du Travail et de la Consommation. Son rôle est la réalisation de veille sanitaire et de recherches sur les santés humaine, animale et végétale. Elle permet l'évaluation des risques sanitaires (chimiques, biologiques, physiques) et réalise des missions de surveillance, l'évaluation de l'efficacité et des risques des médicaments vétérinaires, des produits chimiques, phytopharmaceutiques, des engrais et des biocides.

L'unité de recherche BIPAR (Biologie moléculaire et immunologie parasitaires) réalise des études sur les maladies (zoonotiques ou non) transmises à l'Homme par le biais de la nourriture ou par le biais d'un arthropode vecteur. Leur objectif est de progresser dans le domaine de la détection de ces agents pathogènes, et de leur contrôle pour la santé animale et humaine. La recherche se base alors sur la compréhension des mécanismes de transmission de l'agent pathogène, son développement, et les interactions avec l'hôte et son environnement.

Le groupe Paralim s'intéresse aux parasites zoonotiques transmis par les aliments, dont *Trichinella* sp., *Giardia duodenalis* et *Cryptosporidium* sp. (Tchirvina-Seité *et al.*, 2022).

2. Matériels et méthodes

2.1. Description de la cohorte et période de prélèvement

Au total, 132 prélèvements coprologiques ont été effectués en 26 passages au CHUV-FS entre le 28 juin 2019 et le 25 février 2020, plus fréquemment en début d'automne, environ toutes les deux semaines et une à deux fois par mois en hiver. Ces prélèvements concernaient tous les individus présents dans le centre au moment du passage et qui n'avaient pas déjà été prélevés. En moyenne, les animaux étaient prélevés dans la semaine qui suivait leur arrivée.

Lorsque plusieurs hérissons étaient présents dans une même cage, c'est qu'ils étaient arrivés ensemble ou qu'ils avaient été placés avec une mère adoptive. Dans ce cas, on considère qu'ils possèdent les mêmes agents pathogènes, et leurs fèces ont été mélangés, constituant des lots. Les 132 prélèvements représentent donc un total de 181 individus prélevés. Le Tableau 5 présente les prélèvements effectués, le nombre d'individus pour chaque prélèvement et la période de prélèvement.

Les prélèvements étaient récupérés dans les cages, la litière changée chaque jour garantissant leur fraîcheur. Ils étaient ensuite rapportés au laboratoire de parasitologie du Biopôle pour filtration et dilution, puis conservés dans la chambre froide à +4°C.

Tableau 5 : Nombre de prélèvements effectués et nombre de hérissons prélevés par période d'analyse

Année	Mois	Nombre de prélèvements	Nombre d'individus prélevés
2019	Juin	4	7 (1 lot de 4 individus, et 3 individus seuls)
	Juillet	18	43 (2 lots de 6 individus, 2 lots de 4 individus, 3 lots de 3 individus, 3 lots de 2 individus, 8 individus seuls)
	Aout	18	25 (1 lot de 5 individus, 1 lot de 4 individus et 16 individus seuls)
	Septembre	13	14 (1 lot de 2 individus et 12 individus seuls)
	Octobre	23	30 (3 lots de 3 individus, 1 lot de 2 individus, 19 individus seuls)
	Novembre	21	25 (1 lot de 3 individus, 2 lots de 2 individus, 18 individus seuls)
	Décembre	23	25 (2 lots de 2 individus, 21 individus seuls)
2020	Janvier	9	9 (9 individus seuls)
	Février	3	3 (3 individus seuls)
Total		132	181

Pour 17 individus, un second prélèvement a été réalisé, soit parce qu'ils présentaient des symptômes associés à des troubles digestifs (retard de croissance, diarrhée), soit parce qu'ils avaient été retirés du lot (prélèvement individuel). Ces prélèvements n'ont pas été pris en compte lors de l'analyse statistique.

2.2. Réalisation du prélèvement coprologique

Les numéros d'identification des hérissons d'Europe nouvellement entrés au centre sont repérés dans le cahier d'arrivées. Les cages les hébergeant sont ouvertes, le prélèvement coprologique est effectué à l'aide d'un gant en latex à usage unique. Les fèces sont déposées individuellement dans des pots pour coprologie de 60 mL préalablement identifiés. La quantité récoltée est, si possible, d'environ un gramme. Dans le cas contraire, le maximum possible de fèces est prélevé.

Si les fèces ont un aspect diarrhéique (fèces très molles ou liquides), celui-ci est noté.

Les fèces sont directement amenées au laboratoire de parasitologie du Biopôle, sont pesées, puis une dilution au 10^{ème} est réalisée avec de l'eau distillée et une éprouvette graduée. Le mélange est filtré au-dessus de quatre épaisseurs de gaze et légèrement pressé dans un tube conique de type Falcon (Corning) de 50 mL. Ceux-ci sont conservés à +4°C.

2.3. Comptage par immunofluorescence directe

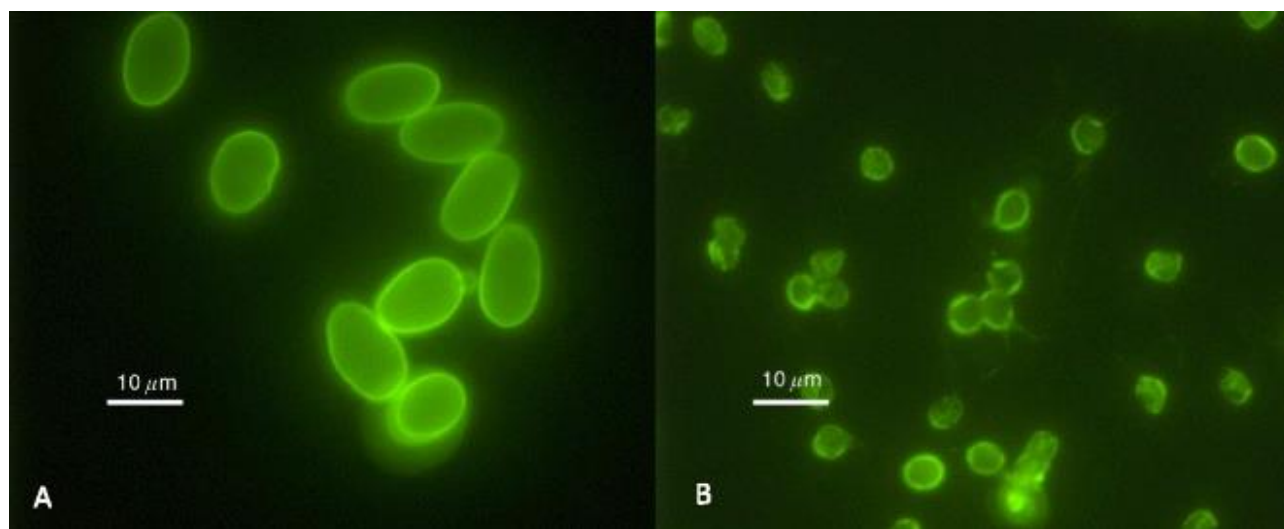
Le filtrat est remis en suspension à l'aide d'un vortex, puis 20 μL sont prélevés à l'aide d'une pipette graduée, et déposés sur une lame d'immunofluorescence comprenant trois puits (kit Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*, Meridian Bioscience).

Les lames sont laissées à sécher à température ambiante pendant au moins 45 min, puis soumises à l'immuno-marquage (protocole complet en Annexe 2).

Lors de l'immunomarquage, les anticorps monoclonaux trouvés dans le kit se fixent à certaines protéines membranaires spécifiques de l'agent pathogène recherché. Ces mêmes anticorps se trouvent couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), les faisant apparaître vert au microscope à fluorescence. Les autres éléments de la préparation sont colorés d'orange mat à rouge grâce au contre-colorant.

Les oocystes de *Cryptosporidium* sp. sont de forme ronde à légèrement ovale, de 2 à 6 μm de diamètre. Les kystes de *Giardia* sp. sont de forme ovale de 8 à 12 μm de long comme visibles sur la Figure 12.

Figure 12 : Images d'immunofluorescence de kystes de *Giardia* sp. (A) et de *Cryptosporidium* sp. (B) au microscope à fluorescence (d'après Balderrama Carmona *et al.*, 2017), semblables aux images observées lors de nos comptages



Le microscope utilisé pour la lecture des lames est un microscope à fluorescence Leica DMI8 au grossissement X40, équipé d'un filtre à fluorescence réglé sur une longueur d'onde de 550 nm, se situant à l'ANSES.

Un prélèvement est considéré comme positif si des kystes ou des oocystes sont vus au microscope à fluorescence. Pour que le résultat soit considéré comme spécifique, il faut que la fluorescence sur la membrane cellulaire soit homogène et continue sur toute la surface cellulaire. Ces oocystes ou kystes sont ensuite comptés sur l'ensemble de la lame, et le nombre total d'oocyste par gramme de fèces est obtenu en réalisant une multiplication prenant en compte la dilution.

2.3.1. Identification par PCR

Les premiers échantillons positifs à la lecture des lames d'immunofluorescence (n=13) ont été concentrés puis l'ADN en a été extrait (protocole complet en Annexe 3 : Protocole d'extraction

de l'ADN). La concentration a pour objectif d'augmenter la concentration en kystes de *Giardia* sp. et en oocystes de *Cryptosporidium* sp. le cas échéant.

2.3.2. Identification de *Cryptosporidium* sp. et séquençage

L'identification de l'espèce de *Cryptosporidium* sp. a été réalisée en plusieurs étapes.

L'infection a tout d'abord été confirmée par la mise en évidence du gène 18S de *Cryptosporidium* sp. que nous avons amplifié et génotypé pour connaître l'espèce infectante. Nous avons également amplifié la séquence du gène codant pour la glycoprotéine de 60 kDa (*gp60*), et génotypé celle-ci pour connaître le sous-type de l'espèce.

Les séquences *gp60* (ADN) et 18S (ARN ribosomal), ont été séparément amplifiées par la technique de la PCR nichée. La PCR nichée est une méthode permettant d'améliorer la spécificité d'amplification et d'augmenter sa sensibilité lorsque le prélèvement contient un faible nombre de parasites. Elle est composée de deux PCR consécutives, réalisées avec des amorces différentes. Le premier couple d'amorces permet la réplication d'un segment qui contient le second couple d'amorces. Puis les échantillons ont été placés sur un gel d'agarose et soumis à une électrophorèse pour comparer leur migration à des marqueurs de poids moléculaire.

L'ADN amplifié obtenu à la fin de la PCR nichée sont envoyés pour un séquençage Sanger chez GenoScreen (Lille, France), qui nous renvoie les résultats sous forme de séquences brutes. Une séquence consensus est obtenue à partir de l'alignement des deux sens de la séquence à l'aide du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor, puis est comparée aux séquences disponibles sur GenBank grâce à l'outil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Le gène *gp60* présente un très grand polymorphisme par la présence de répétitions trinuécléotidiques parmi les espèces de *Cryptosporidium* sp. (Alves *et al.*, 2003). Ainsi, la comparaison à des séquences de référence permet de connaître l'espèce, et parfois même de mettre en évidence des isolats particuliers.

2.3.3. Identification de *Giardia* sp. et séquençage

La confirmation de la présence de kystes de *Giardia* sp. et l'identification de l'assemblage s'est réalisée en plusieurs étapes, en utilisant une PCR nichée ciblant le gène de la glutamate déshydrogénase (*gdh*). Ce gène permet de différencier les assemblages AI, AII, B, C, D, E de *Giardia duodenalis* (Read *et al.*, 2004) lors du portage de *Giardia* sp. chez les mammifères, ce qui constitue une première approche satisfaisante.

Tout d'abord nous avons amplifié le segment d'intérêt (*gdh*) par une PCR nichée. Ensuite, une digestion enzymatique (méthode RFLP) a été réalisée à l'aide de l'enzyme NlaIV sur le fragment d'ADN amplifié. Cette enzyme de restriction coupe l'ADN en segments. Or les assemblages n'ont pas tout à fait le même enchaînement de paires de bases. Donc les segments obtenus seront de tailles différentes.

Par la suite, nous avons réalisé une migration sur gel d'agarose de ces segments d'ADN. Les segments d'ADN sont chargés négativement et migrent sous l'action d'un champ électrique. La distance de migration dépend de la masse moléculaire et donc du nombre de paires de bases des fragments. La comparaison à une échelle de paires de bases nous permet de connaître la taille des fragments et donc d'identifier l'assemblage de *Giardia duodenalis* dont il est question.

De même que pour l'identification de *Cryptosporidium* sp., les segments obtenus à la fin de la PCR nichée sont envoyés pour un séquençage Sanger chez GenoScreen (Lille, France). Une séquence consensus est obtenue à partir de l'alignement des deux sens de la séquence à l'aide du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor, puis est comparée aux séquences disponibles sur GenBank grâce à l'outil BLAST du NCBI.

3. Résultats

3.1. Statistique descriptive

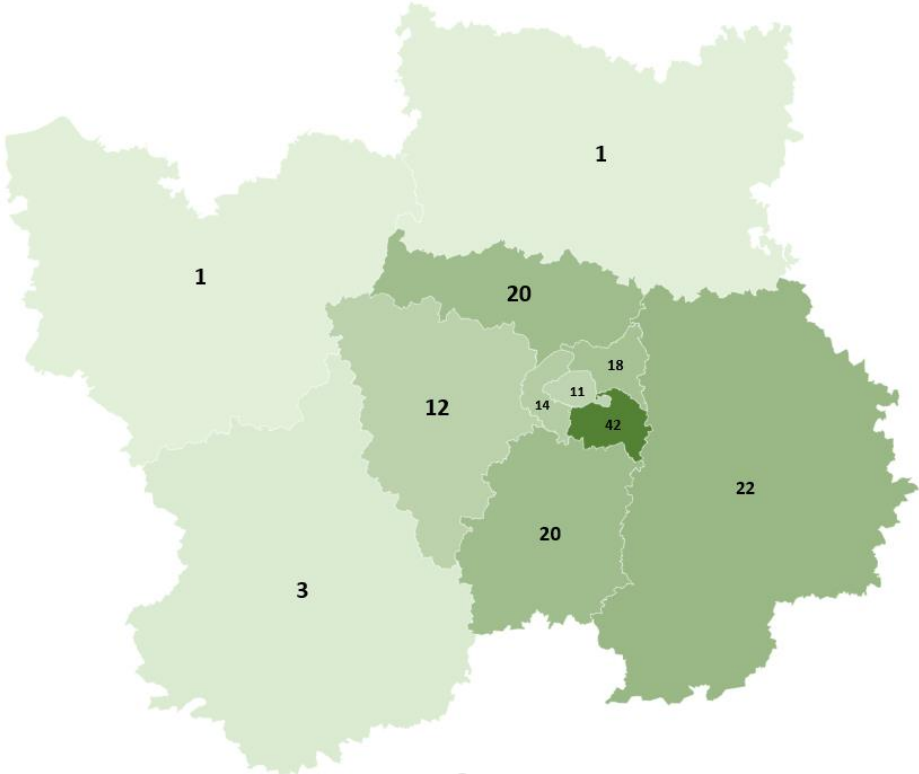
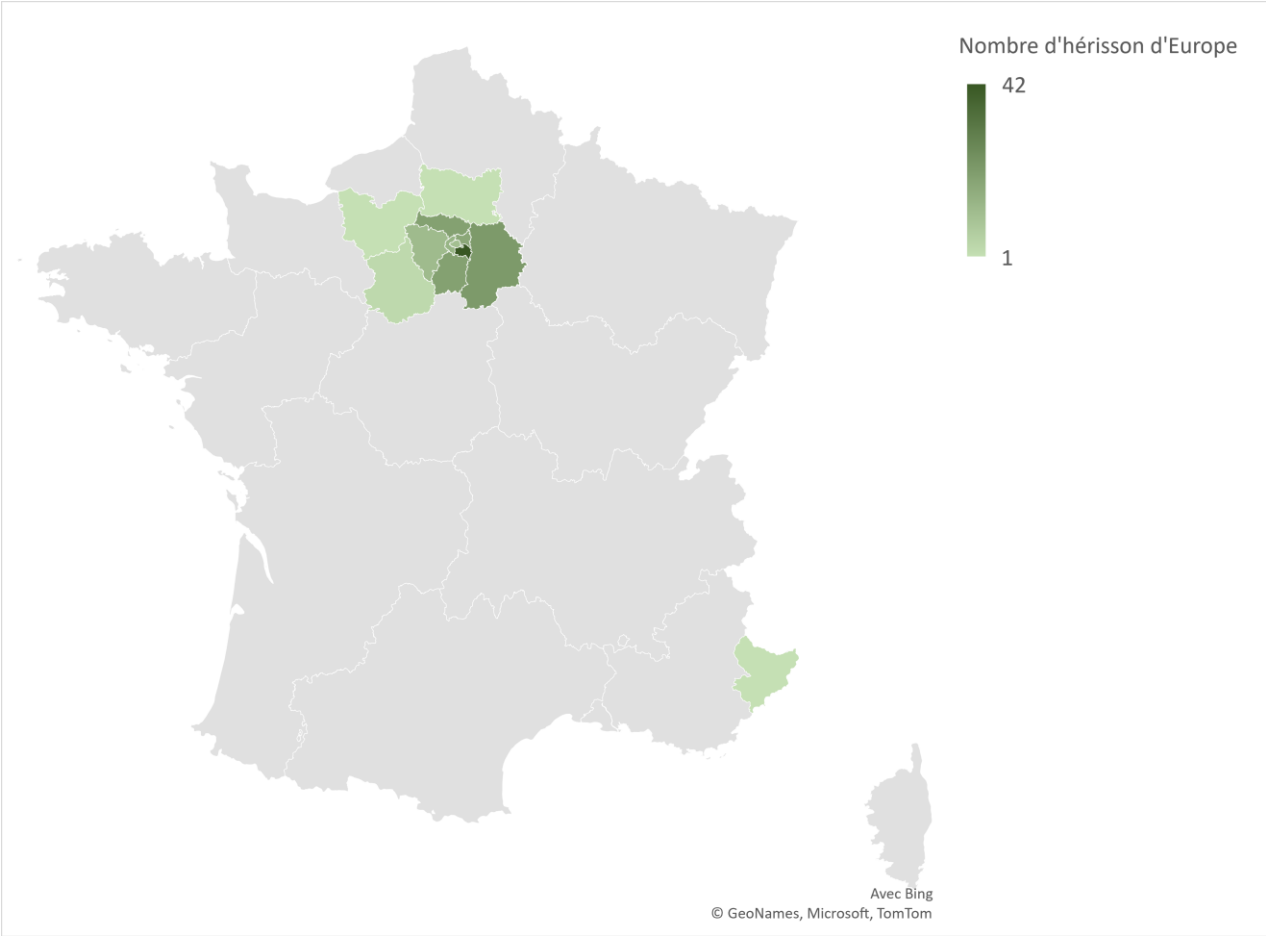
Les hérissons d'Europe ont été classés en trois catégories selon leur poids : les hérissons ayant un poids inférieur à 200 g sont considérés comme des juvéniles allaités, ceux ayant un poids compris entre 200 et 400 g sont considérés comme des juvéniles sevrés, et ceux ayant un poids supérieur à 400 g sont considérés comme adultes. La moitié des selles proviennent de hérissons juvéniles sevrés (Tableau 6).

Tableau 6 : Nombre d'hérissons répartis dans chaque catégorie de classement selon leur poids

	Adultes (> 400 g)	Juvenile sevré (200 g – 400 g)	Juvenile allaité (< 200 g)	Total
Nombre d'hérissons (pourcentage)	59 (33%)	92 (50 %)	30 (17 %)	181

Les hérissons proviennent majoritairement du Val-de-Marne (où est situé le CHUV-FS) et de départements limitrophes à ce département. Seize hérissons ont une provenance non renseignée par les découvreurs et ont été exclus de la Figure 13 présentant le département de provenance des hérissons.

Figure 13 : Départements de provenance des hérissons d'Europe (sont exclus des représentations graphiques les 16 hérissons dont l'origine est inconnue, et sur la seconde représentation, l'unique hérisson provenant des Alpes-Maritimes est exclu)



3.2. Portage de *Cryptosporidium* sp. en fonction de l'âge

Dix-sept échantillons contenant les fèces de 23 hérissons (deux lots de trois hérissons et deux lots de deux hérissons) ont été considérés comme positifs pour *Cryptosporidium* sp., sur 132 échantillons contenant les fèces de 181 hérissons (Tableau 7).

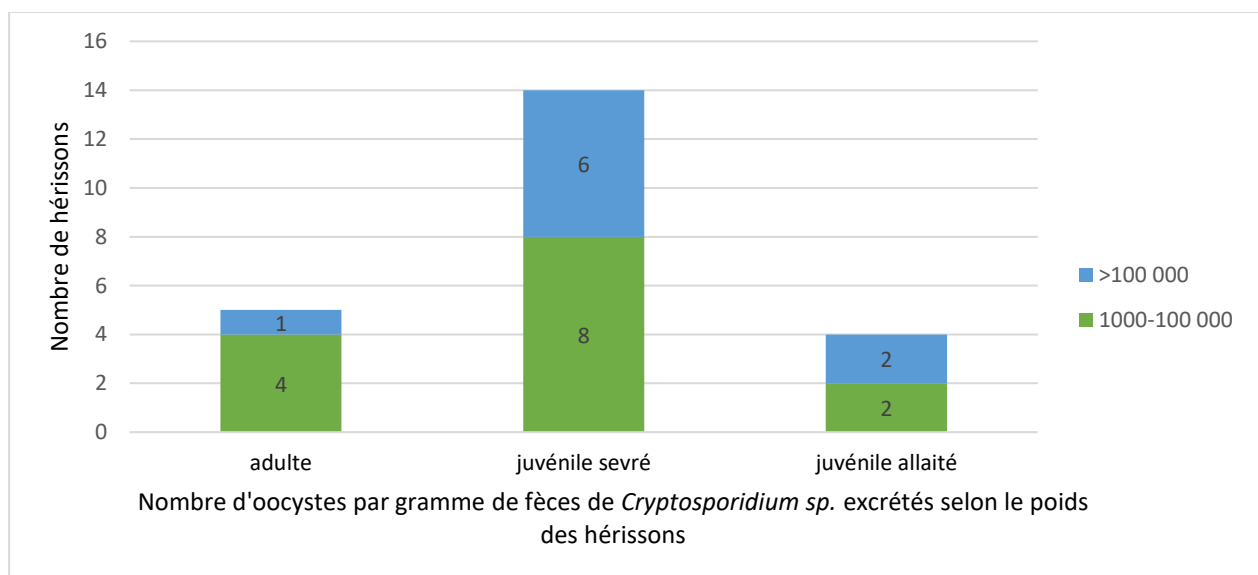
Parmi ceux-ci, six échantillons contenant les fèces de dix hérissons comprenaient également un portage mixte de *Giardia* sp. (deux cages comprenaient trois hérissons chacune).

Tableau 7 : Portage de *Cryptosporidium* sp. en fonction de l'âge (donc du poids) des hérissons

	Adulte	Juvénile sevré	Juvénile allaité	Total
<i>Cryptosporidium</i> sp. seul	2	7	4	13
<i>Cryptosporidium</i> sp. et <i>Giardia</i> sp.	3	7	0	10
Pourcentage d'individus excréteurs	8,5 % (5/59)	15,2 % (14/92)	13,3 % (4/30)	12,7 % (23/181)

La prévalence de *Cryptosporidium* sp. dans cette population d'hérisson était donc de 12,7 %. La catégorie des juvéniles sevrés présentait le plus haut pourcentage d'individus excréteurs, s'élevant à 15,2 %. La répartition des individus positifs et leur plage d'excrétion est présentée en Figure 14. Après analyse quantitative, le comptage des oocystes de *Cryptosporidium* sp. s'échelonnait entre 1500 oocystes par gramme de fèces à 2.10^6 oocystes par gramme de fèces, et est d'une moyenne de $2,5.10^5$ oocystes par gramme de fèces.

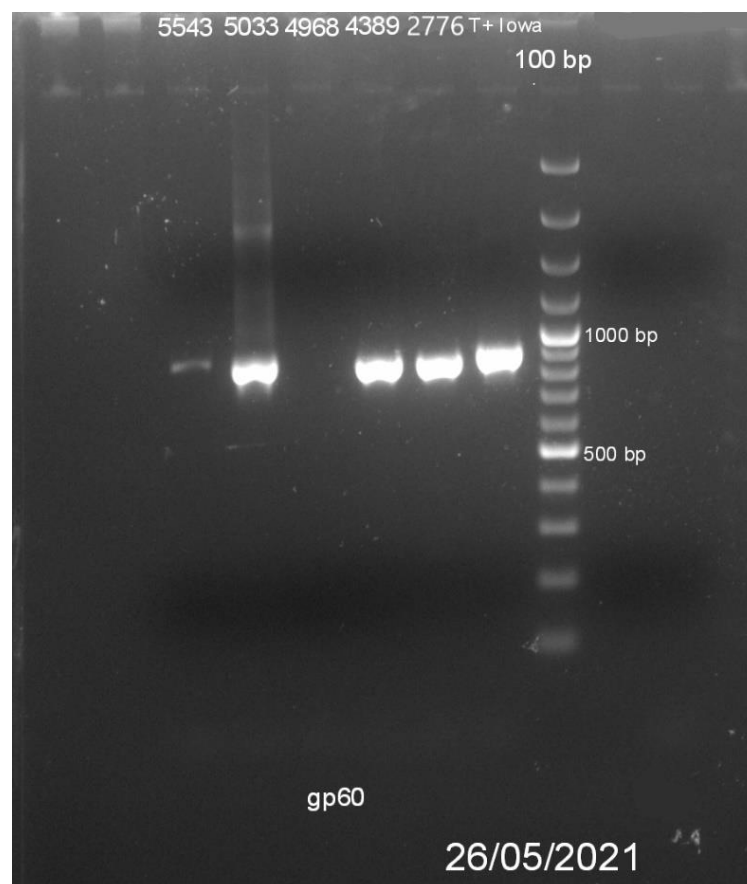
Figure 14 : Nombre de hérissons excréteurs de *Cryptosporidium* sp. en fonction de leur poids et du nombre d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. excrétés



Sur les 19 hérissons présentant de la diarrhée, un seul individu était porteur de *Cryptosporidium* sp. Il s'agissait d'un juvénile sevré, qui excrétaient entre 1 000 et 100 000 oocystes par gramme de fèces ($1,5 \cdot 10^3$ oocystes/g).

Sur les douze individus présentant des oocystes de *Cryptosporidium* sp. dans leurs fèces et soumis à l'amplification des gènes 18S et *gp60* par PCR, nous avons réussi à obtenir les fragments souhaités sur cinq échantillons, visibles suite à leur migration sur la Figure 15. Parmi ces douze individus, onze faisaient partie du lot de hérissons excrétaient entre 1000 et 100 000 oocystes/g et un au lot >100 000 oocystes/g. Les cinq échantillons sur lesquels l'amplification a été possible faisaient partie des hérissons excrétaient entre 1000 et 100 000 oocystes/g. Le séquençage nous a permis d'identifier l'espèce précise : il s'agissait de *Cryptosporidium parvum* pour ces cinq échantillons.

Figure 15 : Photographie du gel après migration du fragment *gp60* de *Cryptosporidium* sp. pour 5 prélèvements, dont une réaction sans amplification qui sera réitérée par la suite. Ces ADN seront ensuite séquencés. (Laboratoire ANSES UMR BIPAR)



3.3. Portage de *Giardia* sp. en fonction de l'âge

Dix-neuf échantillons contenant les fèces de 24 hérissons (deux lots de trois hérissons et deux lots de deux hérissons) ont été considérés comme positifs pour *Giardia* sp., sur 132 échantillons contenant les fèces de 181 hérissons (Tableau 8). Six d'entre eux (contenant les fèces de 10 hérissons) présentaient un portage mixte.

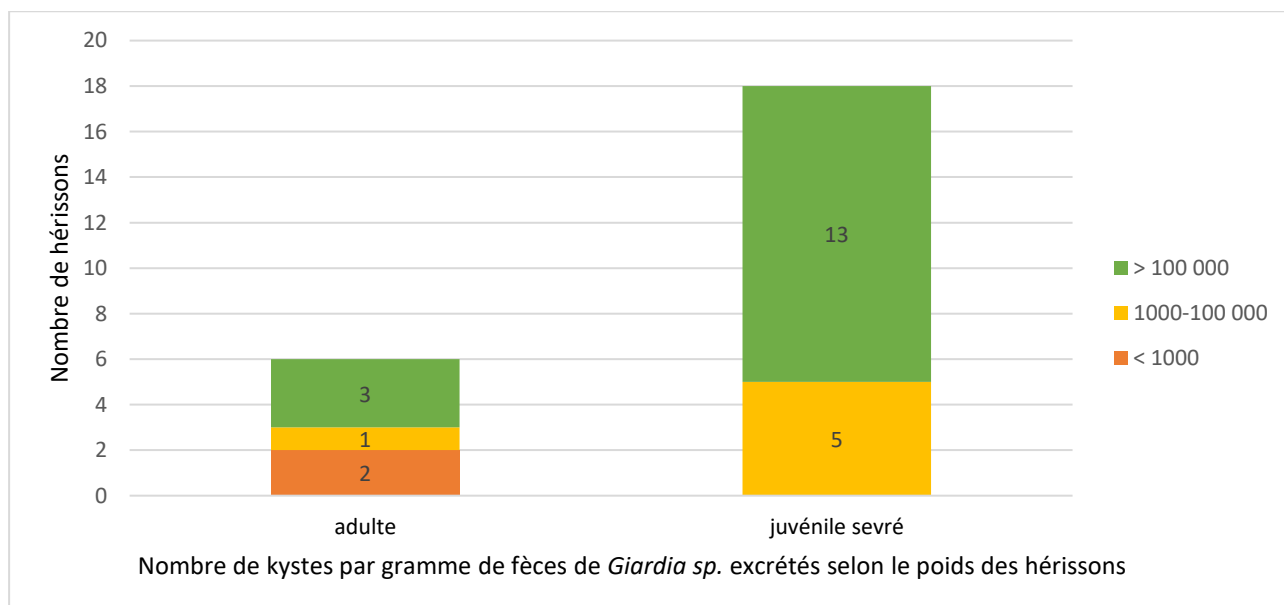
Tableau 8 : Portage de *Giardia* sp. en fonction de l'âge (donc du poids) des hérissons

	Adulte	Juvénile sevré	Juvénile allaité	Total
<i>Giardia</i> sp.	3	11	0	14
<i>Cryptosporidium</i> sp. et <i>Giardia</i> sp.	3	7	0	10
Pourcentage d'individus excréteur dans chaque catégorie	10,1 % (6/59)	19,6 % (18/92)	0 %	13,2 % (24/181)

La prévalence de *Giardia* sp. dans cette population d'hérisson est donc de 13,2 %.

Le comptage exact des kystes de *Giardia* sp. a été effectué sur une partie des échantillons positifs (20/24), et s'échelonnait entre 500 kystes par gramme de fèces à $3,2 \cdot 10^6$ kystes par gramme de fèces. Les quatre échantillons restant présentaient un nombre très élevé de *Giardia* sp. difficilement comptabilisables et ont été placés dans la catégorie d'excrétion supérieure à 100 000 kystes par gramme de fèces. La répartition des hérissons positifs en fonction de leur catégorie d'âge et d'excrétion est représenté sur la Figure 16.

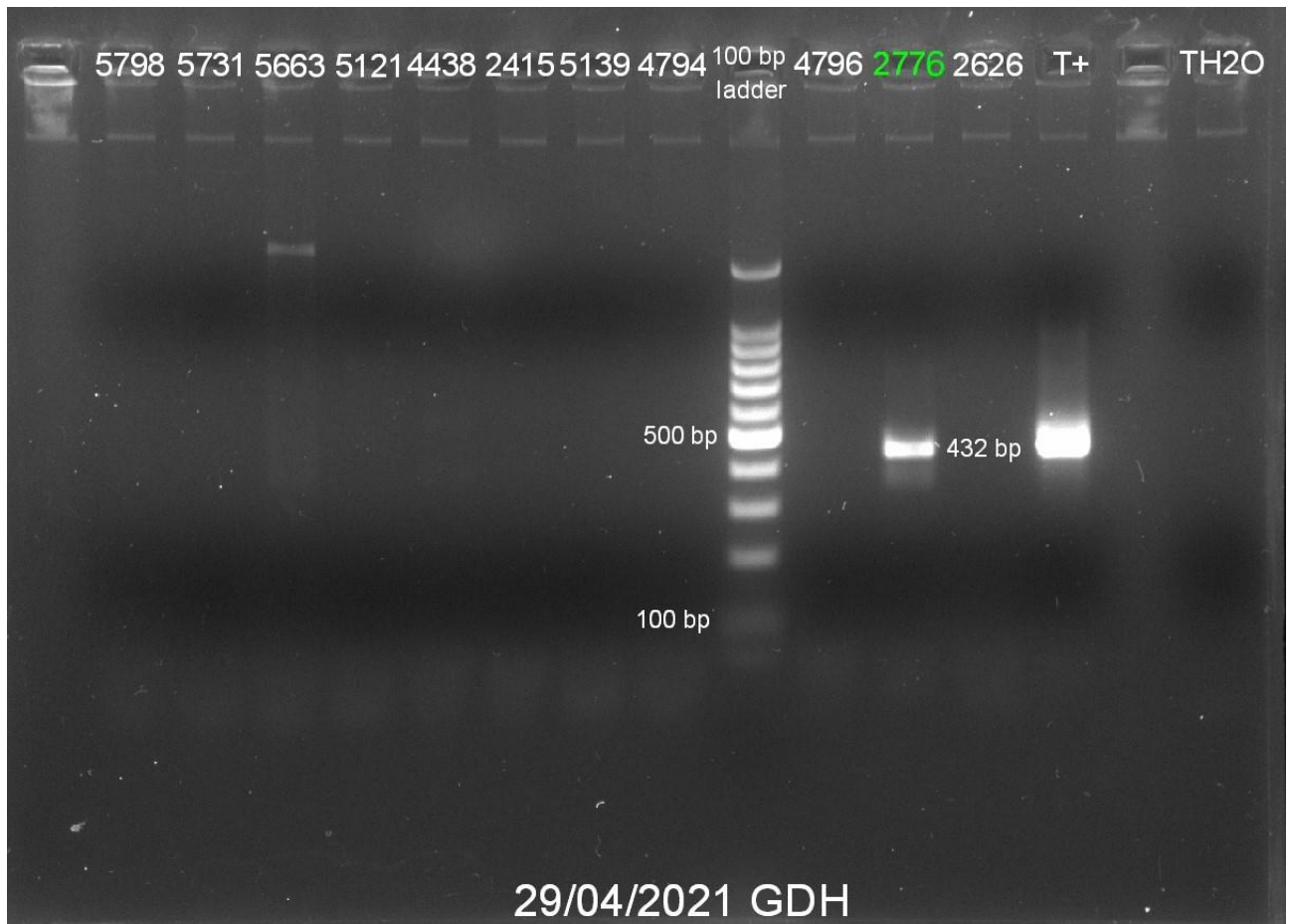
Figure 16 : Nombre de hérissons excréteurs de *Giardia* sp. en fonction de leur poids et du nombre de kystes de *Giardia* sp. excrétés



Sur les 19 hérissons présentant de la diarrhée, seuls deux individus (un adulte et un juvénile sevré) excrétaient des kystes en faible quantité. L'excrétion de l'adulte a été estimée à 500 kystes/g de fèces tandis que l'excrétion du juvénile sevré a été estimée à $1,5 \cdot 10^3$ kystes/g.

Dix-neuf échantillons positifs à *Giardia* sp. ont été soumis à l'amplification par PCR. L'amplification sur le gène de la glutamate déshydrogénase a fonctionné sur cinq d'entre eux, notamment l'échantillon visible par une bande à 432 pb sur la Figure 17.

Figure 17 : Photographie du gel après migration du fragment de gène *gdh* de *Giardia duodenalis* réussie pour un prélèvement, la bande du témoin positif est également visible, de l'eau (TH2O) représente le puit du témoin négatif (Laboratoire ANSES UMR BIPAR)



Après l'amplification, les produits d'amplification ont été digérés par l'enzyme NlaIV et les segments ont été placés dans un gel d'agarose pour leur migration. Il en résulte que trois d'entre eux appartiennent au sous-assemblage A1 de *Giardia duodenalis*. Nous pouvons voir en effet sur la Figure 18 la présence de bandes visibles à 90 pb, 120 pb et 150 pb pour trois échantillons, ce qui est un profil de restriction typique de l'assemblage A1 de *Giardia duodenalis* (Read *et al.*, 2004).

Les échantillons 5472 et 5543 ont une bande visible entre 250 et 300 pb, ce qui pourrait correspondre à l'assemblage B, toutefois, les bandes ne sont pas nettes et le séquençage a échoué sur ces échantillons.

2016). Ceci afin d'augmenter la sensibilité de cette étude, et donc de limiter le nombre de faux négatifs ; mais également d'obtenir des résultats plus fiables sur l'excrétion des éléments parasitaires, dont les variations peuvent être très fortes d'un jour à l'autre. Malgré ces recommandations, Rimhanen-Finne *et al.*, (2007) constatent rétrospectivement dans leur étude que l'analyse d'un seul des deux prélèvements successifs effectués de 5 à 7 jours après le premier prélèvement permettait d'avoir une bonne idée de l'infection par *Giardia duodenalis* mais pas pour *Cryptosporidium* sp..

La lecture des lames a été effectuée par deux observateurs différents, tous formés par la même personne. Certaines lames ont été lues deux fois, une fois par la personne formée, puis par le formateur. L'idéal aurait été une double lecture de l'ensemble des lames pour s'assurer du comptage en kystes et oocystes, en effet, le comptage des kystes et des oocystes au microscope est une technique manquant de reproductibilité, et soumise aux erreurs humaines (Luka *et al.*, 2022).

Enfin, les kystes ont été conservés à -4°C dilués dans de l'eau, pour certains échantillons jusqu'à 21 mois (en raison de l'état d'urgence sanitaire appliqué par le gouvernement français suite à l'épidémie due au Covid-19) avant amplification et génotypage, avec succès pour certains et échec pour d'autres. Or, il n'existe pas à d'étude ce jour étudiant la conservation du matériel génétique de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp. dans ces conditions pour autant de temps.

La conservation des selles contenant les kystes et les oocystes qui a été réalisée n'est pas celle recommandée. En effet, pour la préservation du matériel génétique de *Giardia* sp., Kuk *et al.*, (2012) confirment le stockage à 4°C, mais ne le testent que sur 1 mois, tandis que Wilke and Robertson, (2009) recommandent la conservation dans de l'éthanol (pur, en mélange égal avec l'échantillon), ou dans un volume égal de bichromate de potassium à 5 % à +4°C, plutôt que dans du PBS ou du formalin. Concernant la préservation du matériel génétique de *Cryptosporidium* sp. lors de la conservation des fèces, Abdelsalam *et al.*, (2017) recommandent la congélation à -20°C, et la conservation des oocystes dans du bichromate de potassium à 2,5 % (en proportion non précisée par rapport à l'échantillon) à température ambiante ou à -4°C. Il est tout à fait possible que nos conditions de conservation aient dégradé le matériel génétique de certains échantillons.

4.2. Espèces de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp. obtenues confrontées aux données de la bibliographie

Les seules espèces de *Cryptosporidium* sp. et *Giardia* sp. retrouvées au sein des hérissons testés sont *Giardia duodenalis* et *Cryptosporidium parvum*. Ceci est cohérent avec d'autres études pré-existantes, qui ont déjà révélé le portage de ces deux espèces par le hérisson d'Europe (Krawczyk *et al.*, 2015; Sangster *et al.*, 2016).

Nous avons trouvé l'assemblage A1 de *Giardia duodenalis*, c'est un assemblage présent majoritairement chez les animaux, considéré comme zoonotique (Adam, 2021). L'étude de Sprong *et al.* (2009) soutient qu'il faut étudier les gènes *bg*, *gdh*, *tpi* et la portion d'ADN ribosomal ssU-rRNA, pour être certain du génotype de *Giardia duodenalis* et donc de son potentiel zoonotique. Dans cette étude, nous avons uniquement étudié le gène *gdh* qui n'a été amplifié que sur trois échantillons avec succès. Amplifier sur un autre gène aurait peut-être permis de découvrir d'autres génotypes.

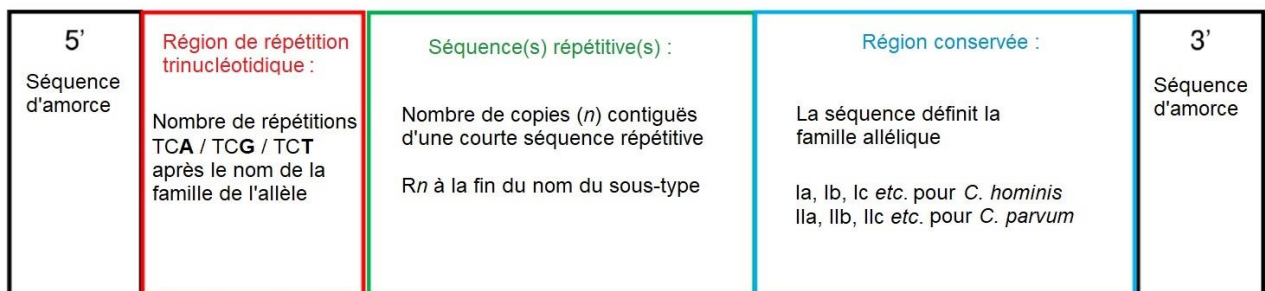
De plus, nous n'avons pas génotypé tous nos échantillons positifs à l'immunofluorescence, car le génotypage a été réalisé au milieu de l'étude mais le génotypage des échantillons restants sera fait à l'avenir. Deux échantillons ont été difficilement amplifiables par PCR et n'ont donc pas donné de résultats conclusifs malgré une bande peu visible sur le gel qui aurait pu nous révéler la

présence de *Giardia duodenalis* appartenant à l'assemblage B. Le génotypage de ces prélèvements sera également à réitérer à l'avenir.

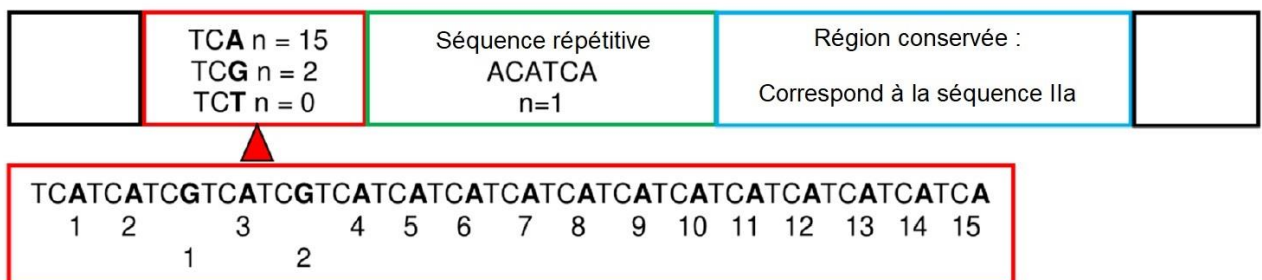
En outre, nous avons ciblé uniquement *Giardia duodenalis*, et pas d'autres espèces de *Giardia* sp., il aurait été intéressant d'élargir notre recherche en étudiant par exemple le gène 18S.

En étudiant le gène *gp60* de *Cryptosporidium* sp., nous avons conclu à *Cryptosporidium parvum*, mais il était possible d'aller plus loin dans son séquençage et connaître le sous-type *gp60* de *C. parvum*. En effet, comme présenté dans la Figure 19 ci-dessous, le gène *gp60* contient une séquence très variable, une séquence constituées de motifs répétitifs et enfin, une séquence conservée permettant de connaître la sous-famille. Le nombre de trinuécléotides et leur type, ainsi que le nombre de séquences répétitives permettent d'apporter une précision au sous-type. L'étudier aurait permis de pouvoir comparer aux autres études et avoir une indication plus précise sur son potentiel zoonotique, il a en effet été mis en évidence que les épidémies en Angleterre et Pays de Galles dues à un contact animal sont plus fréquemment causées par les sous types IlaA15G2R1 et IlaA17G1R1 (Chalmers *et al.*, 2019). Dans notre cas, les séquences trop abimées ne nous ont pas permis de retrouver ces séquences répétitives. Il est également possible que la présence d'un mélange de plusieurs sous-types de *Cryptosporidium parvum* ait brouillé le génotypage de ces répétitions, ce qui est un point intéressant à investiguer par la suite.

Figure 19 : Nomenclature des sous types de *Cryptosporidium* sp. selon le gène *gp60* d'après Chalmers *et al.* (2019), présentant la composition du gène *gp60* et d'un exemple de nomenclature d'un sous type de *C. parvum*



***C. parvum* IlaA15G2R1**



4.3. Prévalence globale de *Cryptosporidium* sp.

La prévalence de *Cryptosporidium* sp. retrouvée dans notre population de hérissons étudiée était de 12,7 %. Ceci est comparable aux valeurs retrouvées au Royaume-Uni, de 8 % (9/111) pour *Cryptosporidium parvum* (Sangster *et al.*, 2016) uniquement chez des individus sevrés ; et aux Pays-Bas, de 9 % (8/90) pour *Cryptosporidium* sp. (Krawczyk *et al.*, 2015).

En revanche, ces valeurs diffèrent à celles obtenues en Allemagne, où la prévalence était de 39,5 % (45/114) chez des animaux en début de réhabilitation (Dyachenko *et al.*, 2010) pour *Cryptosporidium* sp., en République tchèque, où elle était de 73 % (11/15) sur un petit nombre de hérissons (Hofmannová *et al.*, 2016) et au Danemark, où elle était de 5,2 % (14/268) et localisée uniquement dans trois régions. Cette dernière étude diffère des autres par le fait que les hérissons prélevés étaient trouvés morts, le plus souvent (55 % (163/299)) suite à un accident de la voie publique (Rasmussen *et al.*, 2021).

Ces différences peuvent s'expliquer en partie par l'échantillonnage et les méthodes de détection. Dans notre cas et de toutes les études citées ci-dessus, sauf celle de Rasmussen *et al.*, (2021), la collecte a été réalisée sur des animaux en détresse apportés en centre de soin, ce qui peut induire un biais sur le portage. De plus, la détection de ce parasite est toujours difficile et peut là encore induire un biais entre les études (méthodes de détection, opérateurs, etc.).

La détection des oocystes de *Cryptosporidium* sp. par immunofluorescence a une sensibilité élevée, de 97,4 %, et une spécificité de 100 %, mais son coût reste élevé en raison de la nécessité d'avoir un microscope à fluorescence et un personnel de lecture entraîné (Chalmers *et al.*, 2011a; Ryan *et al.*, 2016). C'est pourquoi il est recommandé de réaliser plutôt une PCR qu'une lecture de lames sous immunofluorescence pour augmenter notre sensibilité (Sangster *et al.*, 2016). Ainsi dans notre population de hérissons en soin, d'après nos résultats et les connaissances de spécificité et sensibilité de la méthode utilisée (immunofluorescence), nous pouvons supposer que nos taux d'excrétion sont légèrement sous-estimés.

4.4. Prévalence globale de *Giardia* sp.

Concernant la confiance que nous pouvons accorder à nos résultats, d'après une étude, la qPCR et l'immunofluorescence présentent une plus haute sensibilité que les tests immunologiques. Puisqu'il n'existe actuellement aucun test « Gold Standard » pour la détection des *Giardia* sp., en considérant l'immunofluorescence comme la méthode de référence, la qPCR a une sensibilité de 91 % et une spécificité de 95,1 %. Et en prenant la qPCR comme méthode de référence, l'immunofluorescence a une sensibilité de 50 % et une spécificité de 99,5 % (Gottfred-Rasmussen *et al.*, 2016).

Dans une autre étude, il a été prouvé que la qPCR, le test immunologique et la microscopie (la coloration utilisée n'était pas précisée) avaient une sensibilité proche, respectivement de 99 %, 100 % et 98 %, tandis que la spécificité était de 92 % pour la PCR et de 99 % pour la microscopie (Schoorman *et al.*, 2007).

Il a été prouvé que l'examen d'un échantillon de fèces permettait le diagnostic de 60 % à 80 % des infections liées à *Giardia* sp., que l'analyse de deux échantillons permettait d'augmenter la détection de 80 % à 90 % et qu'enfin, l'analyse de trois échantillons permettait de poser un diagnostic d'infection par *Giardia* sp. dans 90 % des cas, d'où la nécessité de réaliser plusieurs prélèvements (Hooshyar *et al.*, 2019). L'idéal aurait donc été de réaliser plusieurs prélèvements successifs des selles de chaque hérisson pour s'assurer au mieux de l'absence d'infection.

La prévalence trouvée pour la giardiose dans notre population étudiée (13,2 %) se rapproche de celle retrouvée aux Pays-Bas : 11 % (10/90) de portage de *Giardia* sp. dans l'étude de Krawczyk *et al.*, (2015). En revanche, une autre étude réalisée au Danemark (Rasmussen *et al.*, 2021) n'a pas mis en évidence ce parasite chez des hérissons morts, malgré le test de 74 individus. Sachant que ces 299 individus proviennent en majorité (55 % (163/299)) de hérissons victimes d'accident de la

voie publique, nous pouvons supposer que notre prévalence est haute et non applicable aux hérissons sains.

De même que pour *Cryptosporidium* sp., dans notre population de hérissons en soin, d'après nos résultats et les connaissances de spécificité et sensibilité de la méthode de détection utilisée, nous pouvons supposer que nos taux d'excrétion sont sous-estimés. Or les taux d'excrétion observés sont déjà élevés, il convient donc d'établir des mesures de prévention en centre de soin.

4.5. Evaluation de la prise en charge au CHUV-FS

Il n'y a pas de traitements mis en place systématiquement contre la giardiose et la cryptosporidiose au CHUV-FS, or comme nous l'avons démontré, certains hérissons sont porteurs de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp., sans en être symptomatiques, et sont donc plus difficiles à repérer. Ce qui présente un risque certain pour les soigneurs et un agent pathogène de plus en centre capable de contaminer les autres animaux en soin. L'étude de Chappell *et al.*, (1996) prouve que seuls 30 oocystes sont capables d'induire un cycle chez l'hôte contaminé qui devient excréteur, mais c'est à partir de 100 oocystes que des signes cliniques (symptômes digestifs et diarrhée) interviennent. Or un hérisson dans l'étude a excrété 2.10^{10} oocystes par gramme de fèces, il existe un réel aléa pour les soigneurs. Concernant *Giardia duodenalis*, selon Rendtorff (1979) et Teunis *et al.* (1996) 10 kystes suffisent pour que les humains contaminés deviennent excréteurs à leur tour. Teunis *et al.* (1996) mettent en évidence la présence de symptômes suite à l'ingestion de 100 kystes et une probabilité de 100 % d'être infecté suite à l'ingestion de 1000 kystes. L'ingestion d'un seul kyste n'a pas été montré comme infectante mais les auteurs supposent qu'un unique kyste pourrait l'être en conditions idéales, nous pouvons supposer chez un individu immunodéprimé donc.

De plus, en extrapolant ces résultats obtenus chez les humains contaminés expérimentalement avec *Cryptosporidium parvum* aux hérissons, les individus présentant des signes cliniques, dont la diarrhée, sont les plus grands excréteurs et sont plus à même d'excréter sur plusieurs jours consécutifs (mais pas forcément plus longtemps que des personnes asymptomatiques) (Chappell *et al.*, 1996). Nous remarquons que ce n'est pas le cas ici, les hérissons présentant de la diarrhée avaient des échantillons sans kyste ni oocyste visible, et l'unique hérisson présentant des oocystes de *Cryptosporidium* sp. ayant de la diarrhée présentait une excrétion entre 1000 et 100 000 oocystes/g, ce qui pourrait s'expliquer par l'excrétion intermittente et donc nous faire supposer que son taux a été sous-estimé. Les individus présentant de la diarrhée doivent néanmoins être considéré comme potentiellement fort excréteurs.

Il est important de se souvenir que l'infection est fréquemment asymptomatique aussi bien chez les humains que chez les animaux pour *Giardia* sp. et pour *Cryptosporidium* sp.. Miambo *et al.* (2019) ont démontré une prévalence d'environ 8 % et 6 % respectivement chez 156 chiots de moins de 7 mois diagnostiqués par immunofluorescence. Sur ces chiots, seuls trois présentaient de la diarrhée, et parmi ceux-là, un seul était infecté par *Giardia* sp..

De même Rimhanen-Finne *et al.* (2007) ont démontré sur 133 chiens sains que les jeunes chiens étaient plus fréquemment infectés que les adultes pour *Cryptosporidium* sp. et *Giardia* sp. et que la prévalence globale était estimée à 5 % pour les deux parasites. Il conviendra donc de garder en mémoire que les hérissons même asymptomatiques peuvent être porteurs.

Ainsi, un hérisson a été prélevé deux fois, seul son premier prélèvement a été compté dans l'étude, il était alors diarrhéique, et ne comprenait ni oocyste, ni kyste. Prélevé dix jours plus tard, les fèces n'étaient plus diarrhéiques, mais ce juvénile n'avait pas pris de poids et il a été mis en

évidence une excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. Il ne nous est pas possible de savoir s'il s'agit ici d'une contamination à partir de hérissons ayant la cryptosporidiose au même moment au centre, d'une excrétion intermittente ou d'un manque de sensibilité sur le premier prélèvement. Dans un centre de sauvegarde, les moyens de détection étant limités, on privilégiera de très bonnes mesures d'hygiène pour limiter le risque de zoonose et de contamination.

Concernant le traitement des hérissons à risque, si on se fie aux recommandations d'Adam (2021) en se considérant en milieu contaminé, ne seront traités que les hérissons symptomatiques. Un seul hérisson a été prélevé une seconde fois suite à un traitement, comprenant des pansements intestinaux et du métronidazole. Il présentait deux semaines plus tard, une excrétion plus intense d'oocystes de *Cryptosporidium* sp.. Ceci peut s'expliquer par le fait que le métronidazole n'est pas considéré comme une molécule de choix contre *Cryptosporidium* sp.. Il est en revanche recommandé contre *Giardia duodenalis* et la dose de 20 mg/kg/j deux fois par jour est la posologie indiquée par Helmer and Carpenter (2018). Concernant *Cryptosporidium* sp. l'absence de posologie pour le lactate d'halofuginone chez le Hérisson ne permet pas de fournir de recommandation. Il est recommandé à 100 µg/kg/j chez les bovins. Pour ces deux parasitoses il est conseillé de réaliser une correction de la balance électrolytique sanguine quand celle-ci est nécessaire, des soins de *nursing*, la favorisation d'une bonne immunité (par exemple par la prise de colostrum permise par l'adoption des juvéniles orphelins allaitants auprès d'autres mères) et une bonne hygiène (Santin, 2020).

Comme le cas de Davis *et al.* (2022) le témoigne, une détection précoce des individus excréteurs (ici, les rats-laveurs) est nécessaire pour éviter les zoonoses auprès du personnel soignant et notamment à risque, même si cette détection est compliquée en centre de soin pour des raisons financières. Comme vu précédemment, la présence de diarrhée doit alerter, mais l'absence de prise de poids devrait également entraîner des investigations supplémentaires. Ainsi, un hérisson a été prélevé une première fois et ses fèces comprenaient de nombreux kystes de *Giardia* ($1,5 \cdot 10^5$ kystes/g), ce prélèvement est le seul à avoir été pris en compte dans l'étude. Dix-huit jours plus tard, il excréta $4 \cdot 10^4$ kystes/g et son poids était resté à 94 grammes alors qu'il aurait dû presque doubler ce poids initial (Le Barzic, 2013; Mullineaux et Keeble, 2016). Ce hérisson n'était pas diarrhéique. Malheureusement, en l'absence de prélèvement entre ces 18 jours, on ne peut pas savoir s'il s'agit d'une recontamination à partir d'animaux du centre, ou une giardiose persistante.

Malgré ces échantillons qui se sont avérés positifs au CHUV-FS, aucun soigneur ne m'a fait cas de signes cliniques possiblement d'origine zoonotique pendant mes passages lors des récoltes des échantillons au CHUV-FS. Certaines mesures mentionnées dans le règlement intérieur (Arné, 2022) permettent d'éviter la transmission de zoonoses. Par exemple, l'hygiène des mains est importante et il est obligatoire de se laver les mains à l'arrivée, au départ, avant et après manger, de même, la consommation d'aliments ou de boisson est interdite dans les locaux, ce qui diminue fortement le risque d'apporter des kystes ou des oocystes à sa bouche. De plus les incidents impliquant la santé de l'intervenant, notamment les ingestions non désirées doivent être déclarées aux encadrants et mentionner les contacts avec des animaux sauvages est reconnu comme indispensable lors d'une consultation auprès d'un médecin. Enfin, les personnes recevant les traitements immunosuppresseurs ne peuvent pas manipuler les animaux. Ces recommandations sont très importantes pour éviter toute contamination par *Cryptosporidium* sp. et *Giardia* sp. même s'il n'y a pas de détection d'un portage par un hérisson. Quelques recommandations supplémentaires concernant le nettoyage et la désinfection sont mentionnés ci-dessous.

Les kystes de *Cryptosporidium* sp. et les oocystes de *Giardia* sp. sont très difficilement inactivés. Avant toute désinfection, il convient de réaliser un nettoyage scrupuleux, enlever les matières organiques puis nettoyer à l'eau chaude et au savon à minima, avec un détergent si possible (Payne et Artzer, 2009), puis rincer car certains détergents peuvent inactiver les désinfectants. La surface doit en ressortir propre. La plupart des désinfectants nécessitent d'être appliqués sur une surface sèche afin de ne pas être dilués, et nécessitent un temps de contact pour être actif, il faut alors suivre les recommandations du fabricant.

Concernant *Giardia* sp., d'après le centre pour la sécurité alimentaire et la santé publique de l'université de Iowa (CFSPH, 2012), les oocystes de *Giardia* sp. sont sensibles à l'hypochlorite de sodium à 5%, à la plupart des ammoniums quaternaires, au peroxyde d'hydrogène à 6 %, après un temps de contact prolongé (cinq à vingt minutes). Ils sont également sensibles aux UV, à la chaleur et à la dessiccation. Dans une étude menée par Fiechter *et al.* (2012), une désinfection au 4-chlore-M-crésol (Neopredisan® 135-1, Vital AG) dilué à 3 % appliqué à 0,4 L/m² pendant deux heures, puis rincé avec de l'eau à haute pression à 80°C a permis d'arrêter la contamination par *Giardia* sp. dans un chenil. Les chiens ont également été lavés par un shampoing à la chlorhexidine à 4 % pour éliminer les oocystes présent dans le pelage. Cela a également été réalisé dans l'étude de Saleh *et al.* (2016) qui a, de plus, désinfecté les chenils avec une solution d'ammonium quaternaire, et augmenté la température du chenil à plus de 25°C pour favoriser l'inactivation des oocystes.

Concernant *Cryptosporidium* sp., l'étude de Barbee *et al.* (1999) met en évidence une diminution de dix fois ou plus pour l'acide peracétique à 0,2 % et le peroxyde d'hydrogène à 3 %. Seul le peroxyde d'hydrogène à 6 % a réduit de plus de 1000 fois la concentration de kystes. De même que pour *Giardia* sp., les kystes sont sensibles aux UV et à la vapeur (Santin, 2020).

Conclusion

Cette étude a permis d'établir une première approche en France de la cryptosporidiose et la giardiose chez les hérissons d'Europe.

Nous avons vu que les *Cryptosporidium* sp. avaient une large répartition mondiale, un grand nombre d'hôte potentiels selon l'espèce, et un potentiel zoonotique non négligeable pour *C. parvum*.

Nous avons également traité des *Giardia* sp., surtout de *G. duodenalis*, qui présente des hôtes plutôt définis selon les assemblages présentés et également un potentiel zoonotique.

Le Hérisson d'Europe peut héberger ces parasites comme l'ont montré plusieurs études réalisées en Europe, et notre étude est venue le conforter en France. Les prélèvements effectués au CHUV-FS ont ainsi permis de démontrer que le hérisson peut être porteur de *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis*, excrète des kystes et des oocystes en quantité variable, et que toute tranche d'âge est atteinte par les parasites mais ne développe pas forcément de signes cliniques, suggérant que les parasites, en faible quantité, peuvent faire partie du microbiote intestinal du hérisson.

Enfin, nous avons vu que la prise en charge au CHUV-FS était compliquée, et l'étude mériterait d'être approfondie tant pour déterminer des traitements possibles à mettre en œuvre en cas de giardiose ou cryptosporidiose réelle au centre, que pour conclure à une prévalence de la giardiose et de la cryptosporidiose en France.

Le déclin de nombre de hérisson en France reste préoccupant, et peut être lié à l'activité humaine, comme la circulation et l'utilisation abusive de pesticide. De même, le Hérisson peut tout à fait être une victime de la contamination humaine de l'environnement et être contaminé également par *Giardia* sp. et *Cryptosporidium* sp. humains. Ainsi, il serait intéressant d'étudier les différences de contamination entre les hérissons vivant en zone urbaine et plus proche des activités humaines, aux hérissons ruraux.

Liste des références bibliographiques

- ABDELSALAM, I.M., SARHAN, R.M., HANAFY, M.A. (2017) The Impact of Different Copro-preservation Conditions on Molecular Detection of Cryptosporidium Species. *Iranian Journal of Parasitology* vol. 12, n° 2, p. 274-283.
- ADAM, R.D. (2021) Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 34, n° 4, p. 1-35. [<https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19>]
- ADEYEMO, F.E., SINGH, G., REDDY, P., *et al.* (2018) Methods for the detection of Cryptosporidium and Giardia: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Tropica, Recent Advances in Genetic and Molecular Diagnosis of Parasitic Protozoa* vol. 184, p. 15-28. [<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.011>]
- ADKINS, P.R.F. (2022) Cryptosporidiosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Raising Commercial Dairy Calves* vol. 38, n° 1, p. 121-131. [<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.11.009>]
- ADL, S.M., BASS, D., LANE, C.E., *et al.* (2019) Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* vol. 66, n° 1, p. 4-119. [<https://doi.org/10.1111/jeu.12691>]
- ALLAIN, T., BURET, A. (2019) Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. *Advances in parasitology* vol. 107, p. 173-199. [<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.12.001>]
- ALVES, M., XIAO, L., SULAIMAN, I., *et al.* (2003) Subgenotype analysis of Cryptosporidium isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 41, n° 6, p. 2744-2747. [<https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2744-2747.2003>]
- ANKARKLEV, J., JERLSTRÖM-HULTQVIST, J., RINGQVIST, E., *et al.* (2010) Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nature Reviews Microbiology* vol. 8, n° 6, p. 413-422. [<https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>]
- APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C.A., OLSON, M.E. (2005) Giardia and Cryptosporidium in mammalian wildlife--current status and future needs. *Trends in Parasitology* vol. 21, n° 8, p. 370-376. [<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.004>]
- ARNÉ, P. (2022) Règlement intérieur du Chuv-FS, version 5.1. Chuv-FS, Maisons-Alfort.
- BALDERRAMA CARMONA, A.P., GORTÁRES-MOROYOQUI, P., ALVAREZ, L., *et al.* (2017) Perspectives of Quantitative Risk Assessment Studies for Giardia and Cryptosporidium in Water Samples. *Water, Air, & Soil Pollution* vol. 228. [<https://doi.org/10.1007/s11270-017-3333-5>]
- BALDURSSON, S., KARANIS, P. (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Research* vol. 45, n° 20, p. 6603-6614. [<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>]
- BARBEE, S.L., WEBER, D.J., SOBSEY, M.D., *et al.* (1999) Inactivation of Cryptosporidium parvum oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointestinal Endoscopy* vol. 49, n° 5, p. 605-611. [[https://doi.org/10.1016/s0016-5107\(99\)70389-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5107(99)70389-5)]
- BENAMROUZ, S., CONSEIL, V., CREUSY, C., *et al.* (2012) Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by Cryptosporidium parvum (Alveolata: Apicomplexa). *Parasite* vol. 19, n° 2, p. 101-115. [<https://doi.org/10.1051/parasite/2012192101>]
- BESER, J., TORESSON, L., EITREM, R., *et al.* (2015) Possible zoonotic transmission of Cryptosporidium felis in a household. *Infection Ecology & Epidemiology* vol. 5, n° 1, p. 28463-28468. [<https://doi.org/10.3402/iee.v5.28463>]
- BESSOFF, K., SATERIALE, A., LEE, K.K., *et al.* (2013) Drug Repurposing Screen Reveals FDA-Approved Inhibitors of Human HMG-CoA Reductase and Isoprenoid Synthesis That Block

- Cryptosporidium parvum Growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 57, n° 4, p. 1804-1814. [<https://doi.org/10.1128/AAC.02460-12>]
- BESSOFF, K., SPANGENBERG, T., FODERARO, J.E., *et al.* (2014) Identification of Cryptosporidium parvum Active Chemical Series by Repurposing the Open Access Malaria Box. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 58, n° 5, p. 2731-2739. [<https://doi.org/10.1128/AAC.02641-13>]
- BONES, A.J., JOSSE, L., MORE, C., *et al.* (2019) Past and future trends of Cryptosporidium in vitro research. *Experimental Parasitology* vol. 196, p. 28-37. [<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.001>]
- BRAIMA, K., ZAHEDI, A., OSKAM, C., *et al.* (2021) Zoonotic infection by Cryptosporidium fayeri IVgA10G1T1R1 in a Western Australian human. *Zoonoses and Public Health* vol. 68, n° 4, p. 358-360. [<https://doi.org/10.1111/zph.12806>]
- BUDU-AMOAKO, E., GREENWOOD, S.J., DIXON, B.R., *et al.* (2011) Foodborne illness associated with Cryptosporidium and Giardia from livestock. *Journal of Food Protection* vol. 74, n° 11, p. 1944-1955. [<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-107>]
- BUSSIÉRAS, J., CHERMETTE, R. (2002) Fascicule II : Protozoologie. Polycopié. Maisons-Alfort, École Nationale vétérinaire d'Alfort, Unité de Parasitologie.
- CAMA, V.A., BERN, C., ROBERTS, J., *et al.* (2008) Cryptosporidium species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases* vol. 14, n° 10, p. 1567-1574. [<https://doi.org/10.3201/eid1410.071273>]
- CFSPH (2012) Giardiasis. In *The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, College of veterinary medicine*. [<https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/giardiasis.pdf>] (consulté le 01/03/2023).
- CHALMERS, R.M., CAMPBELL, B.M., CROUCH, N., *et al.* (2011a) Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven Cryptosporidium assays used in the UK. *Journal of Medical Microbiology* vol. 60, n° 11, p. 1598-1604. [<https://doi.org/10.1099/jmm.0.034181-0>]
- CHALMERS, R.M., DAVIES, A.P. (2010) Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology, Cryptosporidium and other waterborne protozoa* vol. 124, n° 1, p. 138-146. [<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003>]
- CHALMERS, R.M., KATZER, F. (2013) Looking for Cryptosporidium: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology* vol. 29, n° 5, p. 237-251. [<https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.03.001>]
- CHALMERS, R.M., ROBINSON, G., ELWIN, K., *et al.* (2019) Analysis of the Cryptosporidium spp. and gp60 subtypes linked to human outbreaks of cryptosporidiosis in England and Wales, 2009 to 2017. *Parasites & Vectors* vol. 12, n° 1, p. 95. [<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3354-6>]
- CHALMERS, R.M., SMITH, R.P., HADFIELD, S.J., *et al.* (2011b) Zoonotic linkage and variation in Cryptosporidium parvum from patients in the United Kingdom. *Parasitology Research* vol. 108, n° 5, p. 1321-1325. [<https://doi.org/10.1007/s00436-010-2199-x>]
- CHAPPELL, C.L., OKHUYSEN, P.C., LANGER-CURRY, R.C., *et al.* (2015) Cryptosporidium muris: Infectivity and Illness in Healthy Adult Volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 92, n° 1, p. 50-55. [<https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0525>]
- CHAPPELL, C.L., OKHUYSEN, P.C., LANGER-CURRY, R.C., *et al.* (2011) Cryptosporidium meleagridis: Infectivity in Healthy Adult Volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 85, n° 2, p. 238-242. [<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0664>]
- CHAPPELL, C.L., OKHUYSEN, P.C., STERLING, C.R., *et al.* (1996) Cryptosporidium parvum: Intensity of Infection and Oocyst Excretion Patterns in Healthy Volunteers. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 173, n° 1, p. 232-236. [<https://doi.org/10.1093/infdis/173.1.232>]
- CRESTIA, J., RAZAKANDRAINIBE, R., COSTA, D., *et al.* (2022) « Seven shades of Cryptosporidium ». *Clinical Microbiology and Infection* vol. 28, n° 4, p. 548-549. [<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.04.023>]
- CUNNINGHAM, A.A., DASZAK, P., WOOD, J.L.N. (2017) One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 372, n° 1725. [<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0167>]

- DAVIS, M.K., RILEY, J., DARBY, B., *et al.* (2022) Cryptosporidium parvum outbreak associated with Raccoons at a Wildlife Facility-Virginia, May-June 2019. *Zoonoses and Public Health* vol. 69, n° 3, p. 248-253. [<https://doi.org/10.1111/zph.12924>]
- DIXON, B.R. (2021) Giardia duodenalis in humans and animals - Transmission and disease. *Research in Veterinary Science* vol. 135, p. 283-289. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.034>]
- DONG, S., YANG, Ya, WANG, Y., *et al.* (2020) Prevalence of Cryptosporidium Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitologica* vol. 65, n° 4, p. 882-889. [<https://doi.org/10.2478/s11686-020-00230-1>]
- DUMOULIN, A., GUYOT, K., LELIÈVRE, E., *et al.* (2000) Cryptosporidium et faune sauvage : un risque pour l'homme ? *Parasite* vol. 7, n° 3, p. 167-172. [<https://doi.org/10.1051/parasite/2000073167>]
- DUPONT, H.L., OKHUYSEN, P.C. (1995) The Infectivity of Cryptosporidium parvum in Healthy Volunteers. *The New England Journal of Medicine* vol. 332, n° 13, p. 5. [<https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321304>]
- DUPOUY-CAMET, J., HÉLÈNE, Y., BOUREE, P., *et al.* (2018) Zoonoses parasitaires et faune sauvage. *Épidémiologie et Santé Animale* vol. 71, p. 25-34.
- DYACHENKO, V., KUHNERT, Y., SCHMAESCHKE, R., *et al.* (2010) Occurrence and molecular characterization of Cryptosporidium spp. genotypes in European hedgehogs (Erinaceus europaeus L.) in Germany. *Parasitology* vol. 137, n° 2, p. 205-216. [<https://doi.org/10.1017/S0031182009991089>]
- EFSTRATIOU, A., ONGERTH, J.E., KARANIS, P. (2017) Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research* vol. 114, p. 14-22. [<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>]
- EINARSSON, E., MA'AYEH, S., SVÄRD, S.G. (2016) An up-date on Giardia and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology* vol. 34, p. 47-52. [<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>]
- EL-ALFY, E.-S., NISHIKAWA, Y. (2020) Cryptosporidium species and cryptosporidiosis in Japan: a literature review and insights into the role played by animals in its transmission. *Journal of Veterinary Medical Science* vol. 82, n° 8, p. 1051-1067. [<https://doi.org/10.1292/jvms.20-0151>]
- ELWIN, K., HADFIELD, S.J., ROBINSON, G., *et al.* (2012) The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. *Epidemiology and Infection* vol. 140, n° 4, p. 673-683. [<https://doi.org/10.1017/S0950268811000860>]
- ENEMARK, H.L., AHRENS, P., JUEL, C.D., *et al.* (2002) Molecular characterization of Danish Cryptosporidium parvum isolates. *Parasitology* vol. 125, n° 4, p. 331-341. [<https://doi.org/10.1017/S0031182002002226>]
- FAVENNEC, L. (2012) Épidémiologie et diagnostic de la giardiose humaine: quoi de neuf ? : Dossier Scientifique. *Revue Francophone des Laboratoires, Coprologie parasitaire* vol. 2012, n° 440, p. 35-38. [[https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(12\)71363-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71363-1)]
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., LEE HARDIN, E. (1991) Excystation of Giardia muris Induced by a Phosphate-Bicarbonate Medium: Localization of Acid Phosphatase. *The Journal of Parasitology* vol. 77, n° 3, p. 441-448. [<https://doi.org/10.2307/3283133>]
- FENG, Y., XIAO, L. (2011) Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of Giardia Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 24, n° 1, p. 110-140. [<https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>]
- FIECHTER, R., DEPLAZES, P., SCHNYDER, M. (2012) Control of Giardia infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Veterinary Parasitology* vol. 187, n° 1, p. 93-98. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.023>]
- FORNEY, J.R., VAUGHAN, D.K., YANG, S., *et al.* (1998) Actin-dependent motility in Cryptosporidium parvum sporozoites. *The Journal of Parasitology* vol. 84, n° 5, p. 908-913. [<https://doi.org/10.2307/3284619>]

- FRÉNAL, K., SOLDATI-FAVRE, D. (2013) Un complexe moléculaire unique à l'origine de la motilité et de l'invasion des Apicomplexes. *Médecine/Sciences* vol. 29, n° 5, p. 515-522. [https://doi.org/10.1051/medsci/2013295015]
- GARCIA, L.S., SHIMIZU, R.Y. (1997) Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 35, n° 6, p. 1526-1529. [https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1526-1529.1997]
- GARCIA-R, J.C., FRENCH, N., PITA, A., *et al.* (2017) Local and global genetic diversity of protozoan parasites: Spatial distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 11, n° 7. [https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005736]
- GLABERMAN, S., MOORE, J.E., LOWERY, C.J., *et al.* (2002) Three Drinking-Water-Associated *Cryptosporidiosis* Outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases* vol. 8, n° 6, p. 631-633. [https://doi.org/10.3201/eid0806.010368]
- GOH, S., REACHER, M., CASEMORE, D.P., *et al.* (2004) Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. *Emerging Infectious Diseases* vol. 10, n° 6, p. 1007-1015. [https://doi.org/10.3201/10.3201/eid1006.030325]
- GOTFRED-RASMUSSEN, H., LUND, M., ENEMARK, H.L., *et al.* (2016) Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* vol. 84, n° 3, p. 187-190. [https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.005]
- GRINBERG, A., MARKOVICS, A., GALINDEZ, J., *et al.* (2002) Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. *Veterinary Record* vol. 151, n° 20, p. 606-608. [https://doi.org/10.1136/vr.151.20.606]
- GRISOT, C. (2021) Historique de Faune Alfort, Les évolutions de notre association. In <https://www.faune-alfort.org/qui-sommes-nous/historique/>. (consulté le 02/03/2023).
- GUADANO PROCESI, I., CARNIO, A., BERRILLI, F., *et al.* (2022) *Giardia duodenalis* in colony stray cats from Italy. *Zoonoses and Public Health* vol. 69, n° 1, p. 46-54. [https://doi.org/10.1111/zph.12894]
- GUÉRIN, A., STRIEPEN, B. (2020) The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite *Cryptosporidium*. *Cell Host & Microbe* vol. 28, n° 4, p. 509-515. [https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.007]
- GUO, F., ZHANG, H., FRITZLER, J.M., *et al.* (2014) Amelioration of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro and in vivo by targeting parasite fatty acyl-coenzyme A synthetases. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 209, n° 8, p. 1279-1287. [https://doi.org/10.1093/infdis/jit645]
- GUYOT, K., SARFATI, C., DEROUIN, F. (2012) Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose. *Feuillets de Biologie* vol. 53, n° 304, p. 22-29.
- HAGEN, K.D., MCINALLY, S.G., HILTON, N.D., *et al.* (2020) Microtubule organelles in *Giardia*. *Advances in Parasitology* vol. 107, p. 25-96. [https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.001]
- HAIGH, A., KELLY, M., BUTLER, F., *et al.* (2014) Non-invasive methods of separating hedgehog (*Erinaceus europaeus*) age classes and an investigation into the age structure of road kill. *Acta Theriologica* vol. 59, n° 1, p. 165-171. [https://doi.org/10.1007/s13364-013-0142-0]
- HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P. (2001) Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 39, n° 2, p. 474-477. [https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.474-477.2001]
- HELMER, P.J., CARPENTER, J.W. (2017) Chapter 8 - Hedgehogs. In Carpenter, J.W., Marion, C.J. (Éd.), *Exotic Animal Formulary*, 5ème ed. St Louis, W.B. Saunders. [https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44450-7.00008-4]
- HEWITT, R.G., YIANNOUTSOS, C.T., HIGGS, E.S., *et al.* (2000) Paromomycin: No More Effective than Placebo for Treatment of *Cryptosporidiosis* in Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases* vol. 31, n° 4, p. 1084-1092. [https://doi.org/10.1086/318155]

- HOFMANNOVÁ, L., HAUPTMAN, K., HUCLOVÁ, K., *et al.* (2016) *Cryptosporidium erinacei* and *C. parvum* in a group of overwintering hedgehogs. *European Journal of Protistology* vol. 56, p. 15-20. [<https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.05.002>]
- HOOSHYAR, H., ROSTAMKHANI, P., ARBABI, M., *et al.* (2019) *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* vol. 12, n° 1, p. 3-12.
- JOKIPII, L., JOKIPII, A.M.M. (1986) Timing of Symptoms and Oocyst Excretion in Human Cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine* vol. 315, n° 26, p. 1643-1647. [<https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152604>]
- JONES, K.R., TARDIEU, L. (2021) *Giardia* and *Cryptosporidium* in Neo-Tropical Rodents and Marsupials: Is There Any Zoonotic Potential? *Life* vol. 11, n° 3, p. 256. [<https://doi.org/10.3390/life11030256>]
- KAMYINGKIRD, K., PHOOSANGWALTHONG, P., KLINKAEW, N., *et al.* (2022) Detection of *Giardia duodenalis* Zoonotic Assemblages AI and BIV in Pet Prairie Dogs (*Cynomys ludovicianus*) in Bangkok, Thailand. *Animals* vol. 12, n° 15, p. 1949. [<https://doi.org/10.3390/ani12151949>]
- KHAN, A., SHAIK, J.S., GRIGG, M.E. (2018) Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica, Recent Advances in Genetic and Molecular Diagnosis of Parasitic Protozoa* vol. 184, p. 1-14. [<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>]
- KIRUBAKARAN, S., GORLA, S.K., SHARLING, L., *et al.* (2012) Structure–activity relationship study of selective benzimidazole-based inhibitors of *Cryptosporidium parvum* IMPDH. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* vol. 22, n° 5, p. 1985-1988. [<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.01.029>]
- KLEIN, P. (2008) Preventive and therapeutic efficacy of halofuginone-lactate against *Cryptosporidium parvum* in spontaneously infected calves: A centralised, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The Veterinary Journal* vol. 177, n° 3, p. 429-431. [<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.007>]
- KOTLOFF, K.L., NATARO, J.P., BLACKWELDER, W.C., *et al.* (2013) Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet* vol. 382, n° 9888, p. 209-222. [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)]
- KRAWCZYK, A.I., VAN LEEUWEN, A.D., JACOBS-REITSMA, W., *et al.* (2015) Presence of zoonotic agents in engorged ticks and hedgehog faeces from *Erinaceus europaeus* in (sub) urban areas. *Parasites & Vectors* vol. 8, n° 1, p. 210-216. [<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0814-5>]
- KUCIK, C.J., MARTIN, G.L., SORTOR, B.V. (2004) Common intestinal parasites. *American Family Physician* vol. 69, n° 5, p. 1161-1168.
- KUK, S., YAZAR, S., CETINKAYA, U. (2012) Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* vol. 107, n° 8, p. 965-968. [<https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000800001>]
- KVAC, M., HOFMANNOVÁ, L., HLÁSKOVÁ, L., *et al.* (2014a) *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology* vol. 201, n° 1, p. 9-17. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.014>]
- KVAC, M., SAKOVA, K., KVETONOVA, D., *et al.* (2014b) Gastroenteritis Caused by the *Cryptosporidium* Hedgehog Genotype in an Immunocompetent Man. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 52, n° 1, p. 347-349. [<https://doi.org/10.1128/JCM.02456-13>]
- LAATAMNA, A.E., WAGNEROVÁ, P., SAK, B., *et al.* (2013) Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Veterinary Parasitology* vol. 197, n° 1, p. 350-353. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.041>]
- LE BARZIC, C. (2013) Prise en charge des jeunes mammifères de la faune auvage européenne dans les centres de soin français. Thèse de doctorat vétérinaire. École Nationale vétérinaire d'Alfort.
- LEBBAD, M., WINIECKA-KRUSNELL, J., STENSVOLD, C.R., *et al.* (2021) High Diversity of *Cryptosporidium* Species and Subtypes Identified in Cryptosporidiosis Acquired in Sweden

- and Abroad. *Pathogens* vol. 10, n° 5, p. 523-546. [https://doi.org/10.3390/pathogens10050523]
- LI, N., XIAO, L., ALDERISIO, K., *et al.* (2014) Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases* vol. 20, n° 2, p. 217-224. [https://doi.org/10.3201/eid2002.121797]
- LORA-SUAREZ, F., RIVERA, R., TRIVIÑO-VALENCIA, J., *et al.* (2016) Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Research* vol. 100, p. 377-381. [https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.038]
- LOVE, M.S., BEASLEY, F.C., JUMANI, R.S., *et al.* (2017) A high-throughput phenotypic screen identifies clofazimine as a potential treatment for cryptosporidiosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 11, n° 2. [https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005373]
- LUKA, G., SAMIEI, E., TASNIM, N., *et al.* (2022) Comprehensive review of conventional and state-of-the-art detection methods of *Cryptosporidium*. *Journal of Hazardous Materials* vol. 421. [https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126714]
- MAMMERI, M., CHEVILLOT, A., THOMAS, M., *et al.* (2018) Efficacy of chitosan, a natural polysaccharide, against *Cryptosporidium parvum* in vitro and in vivo in neonatal mice. *Experimental Parasitology* vol. 194, p. 1-8. [https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.003]
- MATSUURA, Y., MATSUBAYASHI, M., NUKATA, S., *et al.* (2017) Report of fatal mixed infection with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal calves. *Acta Parasitologica* vol. 62, n° 1, p. 214-220. [https://doi.org/10.1515/ap-2017-0026]
- MEREDITH, A.L., MILNE, E.M. (2009) Cryptosporidial infection in a captive European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* vol. 40, n° 4, p. 809-811. [https://doi.org/10.1638/2009-0094.1]
- MIAMBO, R.D., LAITELA, B., MALATJI, M.P., *et al.* (2019) Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in young livestock and dogs in Magude District of Maputo Province, Mozambique. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* vol. 86, n° 1. [https://doi.org/10.4102/ojvr.v86i1.1709]
- MILLER, C.N., JOSSE, L., BROWN, I., *et al.* (2018) A cell culture platform for *Cryptosporidium* that enables long-term cultivation and new tools for the systematic investigation of its biology. *International Journal for Parasitology* vol. 48, n° 3, p. 197-201. [https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.10.001]
- MORGAN, U.M., SARGENT, K.D., DEPLAZES, P., *et al.* (1998) Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* vol. 117, p. 31-37. [https://doi.org/10.1017/s0031182098002765]
- MULLINEAUX, E., KEEBLE, E. (2016) BSAVA manual of wildlife casualties., 2ème éd. Gloucester, British Small Animal Veterinary Association.
- NOLAN, M.J., JEX, A.R., KOEHLER, A.V., *et al.* (2013) Molecular-based investigation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from animals in water catchments in southeastern Australia. *Water Research* vol. 47, n° 5, p. 1726-1740. [https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.027]
- O'LEARY, J.K., SLEATOR, R.D., LUCEY, B. (2021) *Cryptosporidium* spp. Diagnosis and Research in the 21st Century. *Food and Waterborne Parasitology* vol. 24, p. 33-48. [https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00131]
- O'NEIL, R.H., LILLEN, R.H., DONALD, B.R., *et al.* (2003) Phylogenetic classification of protozoa based on the structure of the linker domain in the bifunctional enzyme, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 278, n° 52, p. 52980-52987. [https://doi.org/10.1074/jbc.M310328200]
- PAVLI, P., VENKATESWARAN, S., BRADLEY, M., *et al.* (2016) Enhancing *Cryptosporidium parvum* recovery rates for improved water monitoring. *Chemosphere*, The 10th International Symposium on Advanced Environmental Monitoring and Modeling vol. 143, p. 57-63. [https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.021]
- PAYNE, P.A., ARTZER, M. (2009) The Biology and Control of *Giardia* spp and *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* vol. 39, n° 6, p. 993-1007. [https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.007]

- PELLY, H., CORMICAN, M., O'DONOVAN, D., *et al.* (2007) A large outbreak of cryptosporidiosis in western Ireland linked to public water supply: a preliminary report. *Eurosurveillance* vol. 12, n° 18. [<https://doi.org/10.2807/esw.12.18.03187-en>]
- POZIO, E., REZZA, G., BOSCHINI, A., *et al.* (1997) Clinical Cryptosporidiosis and Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Induced Immunosuppression: Findings from a Longitudinal Study of HIV-Positive and HIV-Negative Former Injection Drug Users. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 176, n° 4, p. 969-975. [<https://doi.org/10.1086/516498>]
- PULESTON, R.L., MALLAGHAN, C.M., MODHA, D.E., *et al.* (2013) The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. *Journal of Water and Health* vol. 12, n° 1, p. 41-50. [<https://doi.org/10.2166/wh.2013.097>]
- PUMIPUNTU, N., PIRATAE, S. (2018) Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Veterinary World* vol. 11, n° 5, p. 681-686. [<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.681-686>]
- RAŠKOVÁ, V., KVĚTOŇOVÁ, D., SAK, B., *et al.* (2012) Human Cryptosporidiosis Caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* Isolates Presumably Transmitted from Wild Mice. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 51, n° 1, p. 360-362. [<https://doi.org/10.1128/JCM.02346-12>]
- RASMUSSEN, S.L., HALLIG, J., VAN WIJK, R.E., *et al.* (2021) An investigation of endoparasites and the determinants of parasite infection in European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) from Denmark. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* vol. 16, p. 217-227. [<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.10.005>]
- READ, C.M., MONIS, P.T., ANDREW THOMPSON, R.C. (2004) Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution* vol. 4, n° 2, p. 125-130. [<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.001>]
- REDUKER, D.W., SPEER, C.A. (1985) Factors Influencing Excystation in *Cryptosporidium* Oocysts from Cattle. *The Journal of Parasitology* vol. 71, n° 1, p. 112-115. [<https://doi.org/10.2307/3281988>]
- RENDTORFF, R.C. (1978) The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. In 'Waterborne Transmission of Giardiasis'. W. Jakubowski and J. C. Hoff (eds). U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Centre, Cincinnati, Ohio 45268, U.S.A., EPA-600/9-79-001, pp. 64-81
- RICHES, A., HART, C.J.S., TRENHOLME, K.R., *et al.* (2020) Anti-Giardia Drug Discovery: Current Status and Gut Feelings. *Journal of Medicinal Chemistry* vol. 63, n° 22, p. 13330-13354. [<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00910>]
- RIMHANEN-FINNE, R., ENEMARK, H.L., KOLEHMAINEN, J., *et al.* (2007) Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology* vol. 145, n° 3, p. 345-348. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.008>]
- ROBERTSON, L.J. (2009) *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiology & Infection* vol. 137, n° 7, p. 913-921. [<https://doi.org/10.1017/S0950268809002295>]
- ROELLIG, D.M., SALZER, J.S., CARROLL, D.S., *et al.* (2015) Identification of *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in an epizootological investigation of a laboratory colony of prairie dogs, *Cynomys ludovicianus*. *Veterinary Parasitology* vol. 210, n° 1-2, p. 91-97. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.022>]
- ROSSIGNOL, J.-F.A., AYOUB, A., AYERS, M.S. (2001) Treatment of Diarrhea Caused by *Cryptosporidium parvum*: A Prospective Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Nitazoxanide. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 184, n° 1, p. 103-106. [<https://doi.org/10.1086/321008>]
- RYAN, U., CACCIÒ, S.M. (2013) Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology, Zoonoses Special Issue* vol. 43, n° 12, p. 943-956. [<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>]

- RYAN, U., HIJJAWI, N., FENG, Y., *et al.* (2019) Giardia: an under-reported foodborne parasite. *International Journal for Parasitology* vol. 49, n° 1, p. 1-11. [https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.07.003]
- RYAN, U., POWER, M. (2012) Cryptosporidium species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology* vol. 139, n° 13, p. 1673-1688. [https://doi.org/10.1017/S0031182012001151]
- RYAN, U., ZAHEDI, A., PAPANINI, A. (2016) Cryptosporidium in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology* vol. 38, n° 9, p. 535-547. [https://doi.org/10.1111/pim.12350]
- RYAN, U.M., FENG, Y., FAYER, R., *et al.* (2021) Taxonomy and molecular epidemiology of Cryptosporidium and Giardia – a 50 year perspective (1971–2021). *International Journal for Parasitology, IJP 50th Anniversary Special Issue* vol. 51, n° 13, p. 1099-1119. [https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007]
- SALEH, M.N., GILLEY, A.D., BYRNES, M.K., *et al.* (2016) Development and evaluation of a protocol for control of Giardia duodenalis in a colony of group-housed dogs at a veterinary medical college. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 249, n° 6, p. 644-649. [https://doi.org/10.2460/javma.249.6.644]
- SALLEH, F.M., MOKTAR, N., YASIN, A.M., *et al.* (2014) An improved stool concentration procedure for the detection of Cryptosporidium oocysts in Orang Asli stool samples. *Journal of Microbiological Methods* vol. 106, p. 143-145. [https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.019]
- SANGSTER, L., BLAKE, D.P., ROBINSON, G., *et al.* (2016) Detection and molecular characterisation of Cryptosporidium parvum in British European hedgehogs (Erinaceus europaeus). *Veterinary Parasitology* vol. 217, p. 39-44. [https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.006]
- SANTIN, M. (2020) Cryptosporidium and Giardia in Ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* vol. 36, n° 1, p. 223-238. [https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.005]
- SCHELL, C.J., STANTON, L.A., YOUNG, J.K., *et al.* (2021) The evolutionary consequences of human-wildlife conflict in cities. *Evolutionary Applications* vol. 14, n° 1, p. 178-197. [https://doi.org/10.1111/eva.13131]
- SCHOCH, C.L., CIUFO, S., DOMRACHEV, M., *et al.* (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools : Cryptosporidium. *In Database*. [https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/baaa062/5881509] (consulté le 13/01/2023).
- SCHUURMAN, T., LANKAMP, P., VAN BELKUM, A., *et al.* (2007) Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of Giardia lamblia in human stool specimens. *Clinical Microbiology and Infection* vol. 13, n° 12, p. 1186-1191. [https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01836.x]
- SERRADELL, M.C., SAURA, A., RUPIL, L.L., *et al.* (2016) Vaccination of domestic animals with a novel oral vaccine prevents Giardia infections, alleviates signs of giardiasis and reduces transmission to humans. *NPJ Vaccines* vol. 1, n° 1, p. 1-11. [https://doi.org/10.1038/npjvaccines.2016.18]
- SIEMBIEDA, J.L., MILLER, W.A., BYRNE, B.A., *et al.* (2011) Zoonotic pathogens isolated from wild animals and environmental samples at two California wildlife hospitals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 238, n° 6, p. 773-783. [https://doi.org/10.2460/javma.238.6.773]
- SPRONG, H., CACCIÒ, S.M., GIESSEN, J.W.B. van der, *et al.* (2009) Identification of Zoonotic Genotypes of Giardia duodenalis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 3, n° 12. [https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000558]
- TCHIRVINA-SEITÉ, E., DOMAIN, I., SAYAQUE, A. (2022) UMR Biologie et immunologie parasitaires (BIPAR) du laboratoire de santé animale. *In https://www.anses.fr/fr/content/umr-biologie-et-immunologie-parasitaires-bipar-du-laboratoire-de-sant%C3%A9-animale.* (consulté le 02/03/2023).

- TEUNIS, P.F.M., VAN DER HEIJDEN, O.G., VAN DER GIESSEN, J.W.B., *et al.* (1996) The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens, Rapport n°284550002. In *National Institute for Public Health and the Environment*.
[<https://rivm.openrepository.com/handle/10029/9966>] (consulté le 23/02/2023).
- THOMPSON, J., YANG, R., POWER, M., *et al.* (2008) Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in marsupials in Australia. *Experimental Parasitology* vol. 120, n° 1, p. 88-93.
[<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.05.002>]
- THOMPSON, R.C.A., OLSON, M.E., ZHU, G., *et al.* (2005) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology* vol. 59, p. 77-158. [[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)59002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)59002-X)]
- VIU, M., QUÍLEZ, J., SÁNCHEZ-ACEDO, C., *et al.* (2000) Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Veterinary Parasitology* vol. 90, n° 3, p. 163-170. [[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00241-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00241-7)]
- WALDRON, L.S., DIMESKI, B., BEGGS, P.J., *et al.* (2011) Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 77, n° 21, p. 7757-7765.
[<https://doi.org/10.1128/AEM.00615-11>]
- WANG, R., LI, J., CHEN, Y., *et al.* (2018) Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. *Acta Tropica* vol. 187, p. 257-263. [<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.018>]
- WILKE, H., ROBERTSON, L. (2009) Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* vol. 78, n° 3.
[<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.06.018>]
- XIAO, L. (2010) Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology* vol. 124, n° 1, p. 80-89. [<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>]
- XIAO, L., FAYER, R. (2008) Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology* vol. 38, n° 11, p. 1239-1255.
[<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.006>]
- ZAHEDI, A., PAPANINI, A., JIAN, F., *et al.* (2015) Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* vol. 5, n° 1, p. 88-109.
[<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.12.001>]

Annexe 1 : Noms scientifiques des espèces animales citées

Nom commun	Nom scientifique
Autruche d'Afrique	<i>Struthio camelus</i>
Bar commun	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Barbu de Sumatra	<i>Puntius tetrazona</i>
Bison d'Europe	<i>Bison bonasus</i>
Cacatoès à huppe jaune	<i>Cacatua galerita</i>
Campagnol des champs	<i>Microtus arvalis</i>
Caribou du Canada	<i>Rangifer tarandus</i>
Castor du Canada	<i>Castor canadensis</i>
Cerf des marais	<i>Blastocerus dichotomus</i>
Cerf de Virginie	<i>Odocoileus virginianus</i>
Cerf Sika	<i>Cervus nippon</i>
Chacal commun	<i>Canis aureus</i>
Chameau de Bactriane	<i>Camelus bactrianus</i>
Chat domestique/féral	<i>Felis silvestris catus</i>
Chat de Pallas	<i>Felis manul</i>
Cheval	<i>Equus ferus caballus</i>
Cheval de Przewalski	<i>Equus caballus przewalskii</i>
Chevreuil	<i>Capreolus capreolus</i>
Chien	<i>Canis lupus familiaris</i>
Chien viverrin	<i>Nyctereutes procyonoides</i>
Chimpanzé commun	<i>Pan troglodytes</i>
Chinchilla	<i>Chinchilla lanigera</i>
Coati à nez blanc	<i>Nasua narica</i>
Cobaye	<i>Cavia porcellus</i>
Coyote	<i>Canis latrans</i>
Crapaud masqué	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>
Daim européen	<i>Dama dama</i>
Dindon domestique	<i>Meleagris gallopavo</i>
Dorade royale	<i>Sparus aurata</i>
Dugong	<i>Dugong dugong</i>
Durbec des sapins	<i>Pinicola enucleator</i>
Écureuil gris	<i>Sciurus carolinensis</i>
Écureuil roux	<i>Sciurus vulgaris</i>
Écureuil terrestre de Californie	<i>Spermophilus beecheyi</i>
Eider à duvet	<i>Somateria mollissima</i>
Élan	<i>Alces alces</i>
Éléphant de mer du sud	<i>Mirounga leonina</i>
Fourmilier géant	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>
Furet	<i>Mustela putorius furo</i>
Goéland argenté	<i>Larus argentatus</i>
Gorille des montagnes	<i>Gorilla beringei beringei</i>
Grand Tétré	<i>Tetrao urogallus</i>
Guépard	<i>Acinonyx jubatus</i>
Guppy	<i>Poecilia reticulata</i>
Hamster de Campbell	<i>Phodopus campbelli</i>
Hamster doré	<i>Mesocricetus auratus</i>

Nom commun	Nom scientifique
Hérisson d'Europe	<i>Erinaceus europaeus</i>
Humain	<i>Homo sapiens sapiens</i>
Ibex de Sibérie	<i>Capra sibirica</i>
Kangourou géant	<i>Macropus giganteus</i>
Kangourou gris	<i>Macropus fuliginosus</i>
Lapin de garenne	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Léopard	<i>Panthera pardus</i>
Léopard des neiges	<i>Panthera uncia</i>
Loup gris	<i>Canis lupus</i>
Loup à crinière	<i>Chrysocyon brachyurus</i>
Loutre de rivière	<i>Lontra canadensis</i>
Lycaon	<i>Lycaon pictus</i>
Lynx d'Europe	<i>Lynx lynx</i>
Lynx roux	<i>Lynx rufus</i>
Macaque japonais	<i>Macaca fuscata</i>
Macaque rhésus	<i>Macaca mulatta</i>
Mara de Patagonie	<i>Dolichotis patagonum</i>
Marmotte commune	<i>Marmota monax</i>
Mouffette rayée	<i>Mephitis mephitis</i>
Mouton	<i>Ovis aries</i>
Mulot à collier	<i>Apodemus flavicollis</i>
Néon bleu	<i>Paracheirodon innesi</i>
Ours malais	<i>Helarctos malayanus</i>
Panda géant	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>
Pécari à collier	<i>Pecari tajacu</i>
Phalanger renard	<i>Trichosurus vulpecula</i>
Porc	<i>Sus domesticus</i>
Poule domestique	<i>Gallus gallus domesticus</i>
Rat musqué	<i>Ondatra zibethicus</i>
Raton-laveur	<i>Procyon lotor</i>
Rat surmulot	<i>Rattus norvegicus</i>
Renard	<i>Vulpes vulpes</i>
Renne	<i>Rangifer tarandus</i>
Sanglier d'Europe	<i>Sus scrofa</i>
Serpent des blés	<i>Pantherophis guttatus</i>
Saïmiri de Bolivie	<i>Saimiri boliviensis</i>
Souris	<i>Mus musculus</i>
Souris sylvestre	<i>Peromyscus maniculatus</i>
Souris grise	<i>Mus musculus</i>
Souris à pattes blanches	<i>Peromyscus leucopus</i>
Tamias rayé	<i>Tamias striatus</i>
Tortue bordée	<i>Testudo marginata</i>
Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>
Vache domestique	<i>Bos taurus</i>
Varan émeraude	<i>Varanus prasinus</i>
Vari roux	<i>Varecia rubra</i>
Wallaby des rochers	<i>Petrogale lateralis</i>
Wallaby bicolore	<i>Wallabia bicolor</i>

Annexe 2 : Protocole d'immuno-marquage des kystes de *Giardia duodenalis* et/ou des oocystes de *Cryptosporidium* sp. avec le kit Merifluor

Le kit Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* est issu du laboratoire Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, Ohio, USA.

- Bien homogénéiser l'échantillon et déposer 20 µL dans chaque puits de la lame
- Laisser sécher la lame à température ambiante pendant au moins 45 min
- Fixer à l'acétone sous sorbonne à raison de 20 µL par puit. Les puits doivent être secs avant de rajouter l'acétone
- Laisser sécher l'acétone 10 min sous sorbonne
- Préparer la solution de marquage : diluer l'anticorps « Detection Reagent » au ¼ dans une solution de PBS à raison de 20 µL au total par échantillon, y ajouter le contre-colorant « Counterstain » à raison d'une goutte par échantillon
- Déposer 20 µL de cette solution dans chaque puit
- Incuber la lame en chambre humide à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant au moins 45 min (ou 30 min à 37°C)
- Eliminer la solution de marquage avec la solution de lavage « Wash buffer » une fois en inclinant la lame. Ne pas laisser sécher la lame.
- Monter la lame avec la lamelle avec une solution de montage « Mounting Medium » à raison d'une goutte par échantillon
- Stocker les lames à l'abri de la lumière et attendre 3 à 6 h minimum pour la lecture, lire de préférence le lendemain.

Annexe 3 : Protocole d'extraction de l'ADN

1. Protocole de concentration des échantillons positifs

But : augmenter la concentration en kystes de *Giardia* sp. et en oocystes de *Cryptosporidium* sp..

- Prélever 7 mL de l'échantillon dilué et filtré, le verser dans un tube type Falcon© de 15 mL, y ajouter 6 mL d'éther diéthylique
- Agiter le tube à la main
- Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 500 g à température ambiante
- Eliminer les phases supérieures contenant l'éther diéthylique, les débris et l'eau, et ne garder que le culot qui contient les kystes de *Giardia* sp. et *Cryptosporidium* sp.
- Stocker le tube au congélateur

2. Protocole de réalisation des chocs thermiques

But : rompre la paroi des kystes de *Giardia* sp. et des oocystes de *Cryptosporidium* sp. pour permettre l'extraction d'ADN

- Décongélation
- Rincer avec 250 µL d'eau distillée
- Ajouter 1 mL d'eau distillée
- Transférer 200 µL dans un tube de type Eppendorf© à fond rond de 2mL
- Réaliser au moins 6 alternances d'incubation en Bain Marie à 56°C et de bains froids d'azote liquide

3. Protocole d'extraction de l'ADN

But : extraction de l'acide nucléique des cellules et purification de l'ADN. Ce protocole a été fourni par Qiagen, c'est celui du kit d'extraction : « QIAamp DNA Mini kit ».

- Pipeter 200 µL de notre échantillon et les placer dans un tube de 2 mL
- Ajouter 20 µL de protéinase K en aspirant/refoulant, y ajouter 200 µL de tampon ACL (tampon de lyse), vortexer le mélange 15 secondes
- Incuber le mélange 10 minutes à 56 °C
- Centrifuger le mélange à vitesse maximale pendant 1 minute
- Ajouter 200 µL d'éthanol, vortexer pendant 15 secondes.
- Centrifuger le mélange à vitesse maximale pendant 1 minute
- Placer le mélange dans un tube de 2 mL équipé d'une colonne QIAamp (contenant un filtre)
- Centrifuger le mélange pendant 1 minute
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL et jeter le précédent tube contenant le filtrat
- Ouvrir la colonne et ajouter 500 µL de tampon AWC1 (tampon de nettoyage 1)
- Centrifuger le mélange pendant 1 minute
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL et jeter le précédent tube contenant le filtrat
- Ouvrir la colonne et ajouter 500 µL de tampon AWC2 (tampon de nettoyage 2)

- Centrifuger le mélange pendant 3 minutes à vitesse maximale
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL et jeter le précédent tube contenant le filtrat
- Centrifuger le mélange pendant 1 minutes à vitesse maximale
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 1,5 mL et jeter le précédent tube contenant le filtrat
- Ouvrir la colonne et ajouter 200 µL de tampon AE (tampon de conservation)
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Centrifuger le mélange pendant 1 minutes (élution de l'ADN dans le tampon AE)
- Conserver le filtrat à -20 °C

Annexe 4 : Protocole d'amplification et d'identification moléculaire de *Cryptosporidium* sp. :

1. PCR nichée de la séquence ribosomale 18S

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Acide nucléique cible	Etape	Nom de l'amorce (Eurofins Genomics)	Séquence
ssU-rRNA 18S	1 ^{er} run	F2	TTCTAGAGCTAATACATGCG
		R2	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA
	2 nd run	F3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
		R3	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA

1.1. Amplification 1^{er} run :

- Dans un tube de 2 mL déposer 25 µL de Master Mix (Qiagen, contenant Taq DNA polymerase, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, MgCl₂), 16 µL de Water et 0,5 µL des amorces F2 et R2 (pour chaque échantillon),
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle
- Distribuer 42 µL du mélange ainsi préparé dans des tubes de 0,2 mL autant de fois que d'échantillon
- Préparer au même moment un témoin d'amplification (42 µL de Master Mix et 8µL de Water).
- Préparer un témoin d'amplification : 42 µL de Master Mix et 8 µL de Water
- Préparer un témoin d'amplification : 42 µL de Master Mix et 8 µL d'ADN extrait d'oocystes de la souche Iowa de *C. parvum* (Waterborne Inc, New Orleans, Louisiane, USA)
- Mélanger l'ADN extrait préalablement en refoulant avec la micropipette et en ajouter 8 µL dans le tube contenant les 42 µL de Master Mix
- Déposer les tubes des échantillons et le tube témoin d'amplification dans le thermocycleur
- L'amplification est effectuée dans un thermocycleur, Thermal Cycler G(STORM), programme Crypto 18S, avec, pour les deux tours de PCR :
 - Heat lid : 112°C
 - Dénaturation : 94°C, 10 min
 - Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 94°C, 45 sec
 - Hybridation : 55°C, 45 sec
 - Elongation : 72°C, 1 min
 - Elongation finale : 72°C, 5 min

1.2. Amplification 2nd run :

- Dans un tube de 2 mL déposer 25 µL de Master Mix, 19 µL de Water et 0,5 µL des amorces F3 et R3 (pour chaque échantillon)
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle
- Distribuer le mélange ainsi préparé à raison de 45 µL dans chaque tube de 0,2 µL, préparer au même moment un témoin d'amplification (45 µL de Master Mix et 5 µL de Water)
- Mélanger l'ADN extrait préalablement en refoulant avec la micropipette et ajouter 5 µL dans le tube contenant les 45 µL de Master Mix
- Déposer les tubes des échantillons et le tube témoin d'amplification dans le thermocycleur
- L'amplification est effectuée dans un thermocycleur, Thermal Cycler G(STORM), programme Crypto 18S comme dans l'amplification 1^{er} run

1.3. Migration sur gel

- Préparer les produits d'amplification avec le tampon de charge (8,4 µL produits amplifiés mélangés à 1,6 µL de tampon de charge),
- Déposer 5 à 6 µL de Ladder 100 pb sur le gel d'agarose
- Déposer 10µL du produit d'amplification sur le gel d'agarose 2 % dans du tampon TAE 1 X
- Déposer 10µL du témoin composé d'ADN extrait d'oocystes de la souche Iowa de *C. parvum* (Waterborne Inc, New Orleans, Louisiane, USA), et 10 µL du témoin négatif composé d'eau
- Effectuer une migration à voltage constant (100 V) pendant 1h à 1h15 mn
- Visualiser l'ADN sous UV
- La taille des fragments obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire de 100 pb.

2. PCR nichée du gène *gp60*

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Acide nucléique cible	Etape	Nom de l'amorce (Eurofins Genomics)	Séquence
<i>gp60</i>	1 ^{er} run	GP60F1A	ATAGTCTCCGCTGTATTA
		GP60F1 (AL3531)	ATAGTCTCCGCTGTATTC
		GP60R1 (AL3535)	GGAAGGAACGATGTATCT
	2 nd run	GP60F2A	TCCGCTGTATTATCAGCC
		GP60F2 (AL3532)	TCCGCTGTATTCTCAGCC
		GP60R2 (AL3534)	GCAGAGGAACCAGCATC

2.1. Amplification 1^{er} run

- Dans un portoir réfrigéré, préparer autant de microtubes de 0,2 mL que d'échantillons à traiter + 2 témoins. Préparer le mix pour n+2 échantillons.
- Pour un échantillon :
 - 10 µl de Phusion HF Buffer 5X
 - 4 µl de dNTPs à 2,5 mM
 - 1,25 µL de chaque amorce F1 et F1A à 10 µM
 - 2,5 µL de l'amorce R1 à 10 µM
 - 0,5 µL de Taq polymerase à 2 U/µl
 - 20,5 µL de Water
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle,
- Distribuer 40 µL de mix dans chaque microtube
- Déposer 10 µl d'ADN dans les microtubes échantillon, et pour les témoins, 10 µl d'ADN extrait d'oocystes de la souche Iowa de *C. parvum* (Waterborne Inc, New Orleans, Louisiane, USA) et 10 µl d'eau
- Centrifuger les microtubes ainsi préparés et les déposer dans le thermocycleur
- Lancer le programme qui suit :
 - Heat lid : 112°C
 - Dénaturation : 98°C, 30 sec
 - Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 5 sec
 - Hybridation : 60°C, 10 sec
 - Elongation : 72°C, 15 sec
 - Elongation finale : 72°C, 1 min

2.2. Amplification 2nd run

- Dans un portoir réfrigéré, préparer autant de microtubes de 0,2 mL que de tube du 1^{er} run + 1 témoin négatif. Préparer le mix pour n+1 tube.
- Pour un tube :
 - 10 µl de Phusion HF Buffer 5X
 - 4 µl de dNTPs à 2,5 mM
 - 1,25 µL de chaque amorce F2 et F2A à 10 µM
 - 2,5 µL de l'amorce R2 à 10 µM
 - 0,5 µL de Taq polymerase à 2 U/µl
 - 28,5 µL de Water
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle,
- Distribuer le mélange ainsi préparé à raison de 48 µL dans chaque microtube.
- Déposer 2 µl d'amplicon dans les microtubes échantillon et 2 µl d'eau dans le témoin négatif.
- Centrifuger les microtubes ainsi préparés et les déposer dans le thermocycleur
- Lancer le programme qui suit :
 - Heat lid : 112°C
 - Dénaturation : 98°C, 30 sec

- Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 5 sec
 - Hybridation : 60°C, 10 sec
 - Elongation : 72°C, 15 sec
 - Elongation finale : 72°C, 1 min

2.3. Migration sur gel

- Préparer un gel d'agarose 2 % en tampon TAE 1 X contenant 2 gouttes de BET pour 100ml de gel.
- Mélanger une goutte (environ 1,6 µl) de tampon de charge 6X avec 8,4 µl de produits d'amplification sur un morceau de parafilm.
- Déposer ce mélange (10µl) dans un puit du gel
- Déposer les témoins composé d'ADN extrait d'oocystes de la souche Iowa de *C. parvum* (Waterborne Inc, New Orleans, Louisiane, USA), et d'eau (10 µL)
- Déposer 8 µL de Ladder 100pb (marqueur de poids moléculaire)
- Migrer à voltage constant (100 V) pendant 1h à 1h15 mn
- Visualiser l'ADN sous UV, à l'aide du lecteur Biorad
- La taille des fragments obtenus est déterminée par comparaison avec les marqueurs de taille moléculaire

Annexe 5 : Protocole d'amplification et d'identification moléculaire de *Giardia* sp.

1. PCR nichée du gène *gdh*:

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Gène cible	Etape	Nom de l'amorce	Séquence
<i>gdh</i>	1 ^{er} run	GDHeF	TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT
	2 nd run	GDHiF	CAGTACAACCTCYGCTCTCGG
	1 ^{er} run et 2 nd run	GDHiR	GTTRTCCTTGCACATCTCC

(d'après Read *et al.*, 2004)

Le mix dont il est question pour la PCR nichée est le "AccuStart II GelTrack PCR ToughMix" du laboratoire QuantaBio qui est un mélange contenant, entre autres du MgCl₂, les monomères précurseurs de l'ADN (dNTP), du tampon de réaction et de l'ADN polymérase (hot start).

1.1. Amplification 1^{er} run

- Le mélange composé de :
 - 25 µL de mix
 - 3 µL ADN
 - 1 µL amorce GDHeF
 - 1 µL amorce GDHiR
 - 5 µL BSA
 - 15 µL H₂O
- Préparer deux témoins, contenant respectivement à la place des 3 µL d'ADN, 3 µL d'eau et 3 µL d'ADN extrait de kystes de *G. duodenalis* assemblage B, isolat humain H-3 (P101 @ 5x10/6 Waterborne Inc, New Orleans, Louisiane, USA).
- Réalisation de 55 cycles comme suit :
 - 94°C 2min
 - 94°C 2min
 - 56°C 60 sec
 - 72°C 2min
 - 72°C 7min
 - 10°C ∞

1.2. Amplification 2nd run

- Le mélange est composé de :
 - 25 µL de mix
 - 5 µL du produit de la PCR primaire
 - 1 µL amorce GDHiF
 - 1 µL amorce GDHiR
 - 18 µL H₂O

- Réalisation de 35 cycles comme suit :
 - 94°C 2 min
 - 94°C 30 sec
 - 56°C 20 sec
 - 72°C 45 sec
 - 72°C 7 min
 - 10°C ∞
- Digestion enzymatique :
 - Déposer dans un tube Eppendorf© de 1,5 mL placé dans un bloc froid sous une hotte ADN, 10 µL de produit ADN amplifié du 2nd « run » de la PCR nichée avec le gène *gdh* (glutamate deshydrogénase), 7,6 µL d'H₂O purifiée (MilliQ©) stérile, 2 µL de buffer (tampon servant de solvant pour l'enzyme) et 0,4 µL d'enzyme de restriction NlaIV
 - Vortexer et centrifuger
 - Incuber le tube 3h00 dans un bain marie à 37°

1.3. Migration sur gel

- Préparer la veille une solution à 2 % de MetaPhor Agarose dans du TAE 1X et la mettre à +4°C pour la nuit
- Faire fondre la solution d'agarose le jour de la digestion puis ajouter 2 gouttes de BET
- Laisser polymériser sous hotte chimique à température ambiante
- Déposer le produit de la digestion (20 µL) auquel on a ajouté 4µl du tampon de charge dans les puits du gel d'agarose 2 %
- Déposer les témoins : 20 µL de l'ADN extrait des kystes de *G. duodenalis* assemblage B, isolat humain H-3 (P101 @ 5x10/6 Waterborne Inc, New Orleans, Louisiane, USA) dans un puit, et 20 µL d'eau dans un autre puit.
- Déposer 7 µL de ladder 50 pb
- Faire migrer 3h00 à 70 V
- Visualiser l'ADN sous UV

On utilise l'enzyme de restriction NlaIV car la taille des fragments découpés nous permet de connaître l'assemblage de *Giardia* sp. dont il est question. L'enzyme NIA IV coupe au milieu de nucléotides compris dans une séquence suivante GGN/NCC (séquence palindromique), N étant des nucléotides quelconques. Les petites tailles de fragments ne sont pas utilisées pour différencier les assemblages car ils n'apparaissent pas de manière fiable sur le gel. (Read *et al.*, 2004).

Assemblage	Tailles de fragments obtenus	Profil génotypique visualisé
AI	16, 18, 39, 123, 149	90, 120, 150
All	16, 18, 39, 72, 77, 87, 123	70, 80, 90, 120
BIII, BIV (différenciable par une autre enzyme de restriction : Rsa I)	18, 123, 291	120, 290
C	18, 31, 72, 123, 187	70, 120, 190
D	18, 39, 126, 249	120, 250
E	16, 18, 72, 106, 218	80, 100, 220

DÉTECTION ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES *CRYPTOSPORIDIUM* SP. ET DES *GIARDIA* SP. CHEZ LES HÉRISSEONS EUROPÉENS (*ERINACEUS EUROPAEUS*) ARRIVÉS AU CHUV-FS DE L'ENVA

AUTEUR : Camille SRUN

RÉSUMÉ :

La giardiose et la cryptosporidiose sont des parasitoses digestives cosmopolites, dues respectivement aux protozoaires *Giardia* sp. et *Cryptosporidium* sp.. Ces deux parasites peuvent infecter de nombreux vertébrés, dont l'Homme et le hérisson d'Europe (*Erinaceus europaeus*). La proximité du hérisson avec les habitations humaines et sa forte concentration en milieu urbain en fait un hôte potentiel dont il est intéressant de connaître le portage.

Les hérissons sont porteurs de *Cryptosporidium* sp., et de *Giardia* sp., comme l'ont montré plusieurs études en Europe. À notre connaissance, aucune étude n'a été publiée en France sur ce sujet, c'est pourquoi j'ai réalisé des prélèvements au CHUV-FS (Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de la Faune Sauvage) situé à Maisons-Alfort afin d'évaluer le portage.

J'ai prélevé les selles de 181 hérissons répartis en trois groupes selon leur poids, en début de réhabilitation au CHUV-FS entre le 28 juin 2019 et le 25 février 2020 afin de connaître la prévalence dans cette population de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp..

Une première analyse par immunofluorescence a montré une prévalence de 12,7 % pour *Cryptosporidium* sp., et 13,2 % pour *Giardia* sp.. Après PCR et séquençage les échantillons analysés étaient positifs à *Cryptosporidium parvum* (cinq échantillons) et à l'assemblage AI de *Giardia duodenalis* (trois échantillons).

Les hérissons semblent présenter rarement des symptômes, sur les 20 hérissons totaux présentant de la diarrhée, seuls deux individus présentant des *Giardia* sp., un appartenant aux adultes et un aux juvéniles sevrés excrétaient des kystes, seul un individu présentant des *Cryptosporidium* sp. appartenant aux juvéniles sevrés et excrétaient $1,5 \cdot 10^3$ oocystes par grammes de fèces présentait de la diarrhée.

Ces deux protozoaires étant zoonotiques, le hérisson est potentiellement un réservoir d'agent pathogènes pour l'humain. Ainsi, les centres de soin doivent informer et instaurer des règles d'hygiène pour éviter la contamination du personnel soignant.

MOTS CLÉS :

PARASITE, CRYPTOSPORIDIUM, GIARDIA, HÉRISSEON, PRÉVALENCE, PORTAGE, GÉNOTYPAGE, FRANCE

JURY :

Président : Pr Karim ADJOU

Directrice de thèse : Dr Veronica RISCO-CASTILLO

Examineur : Dr Pascal ARNÉ

Invitée : Myriam THOMAS

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SP. AND *GIARDIA* SP. IN EUROPEAN HEDGEHOGS (*ERINACEUS EUROPAEUS*) AT THE CHUV-FS OF ENVA

AUTHOR: Camille SRUN

SUMMARY:

Giardiasis and cryptosporidiosis are cosmopolitan digestive parasite diseases, caused by the protozoa *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. respectively. Both parasites can infect many vertebrates, including Humans, as well as the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). The proximity of the hedgehog to human habitations and its high concentration in urban areas makes it a potential host whose carriage is of interest.

Hedgehogs are carriers of *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. as shown by several studies in Europe. To our knowledge, no study has been published in France on this subject, so I took samples at the CHUV-FS (Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de la Faune Sauvage) located in Maisons-Alfort in order to evaluate the carriage.

I took stool samples from 181 hedgehogs divided into three groups according to their weight, at the beginning of their rehabilitation at the CHUV-FS between June 28, 2019 and February 25, 2020 in order to know the prevalence of *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in this population.

A first analysis by immunofluorescence showed a prevalence of 12.7 % for *Cryptosporidium* sp. and 13.2 % for *Giardia* sp. in this hedgehog population. After PCR and sequencing the samples analysed were positive for *Cryptosporidium parvum* (five samples) and for the AI assembly of *Giardia duodenalis* (three samples).

Hedgehogs appear to rarely show symptoms, of the 20 total hedgehogs showing diarrhoea, only two individuals showing *Giardia* sp., one belonging to the adults and one to the weaned juveniles excreted cysts, only one individual showing *Cryptosporidium* sp. belonging to the weaned juveniles and excreting $1.5 \cdot 10^3$ oocysts per gram of faeces showed diarrhoea.

As both protozoa are zoonotic, hedgehogs are potentially a reservoir of human pathogens. Thus, wildlife care centers must provide information and institute hygiene rules to avoid disease transmission to caregivers.

KEYWORDS:

PARASITE, CRYPTOSPORIDIUM, GIARDIA, HEDGEHOG, PREVALENCE, CARRIAGE, GENOTYPING, FRANCE

JURY:

Chairperson: Pr Karim ADJOU

Thesis Director: Dr Veronica RISCO-CASTILLO

Reviewer: Dr Pascal ARNÉ

Guest: Myriam THOMAS