



HAL
open science

Étude épidémiologique et moléculaire du Cryspovirus (CSPV-1) dans les espèces de cryptosporidium qui circulent chez l'homme et les ruminants en France

Étienne Carvin

► **To cite this version:**

Étienne Carvin. Étude épidémiologique et moléculaire du Cryspovirus (CSPV-1) dans les espèces de cryptosporidium qui circulent chez l'homme et les ruminants en France. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04415135

HAL Id: dumas-04415135

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04415135v1>

Submitted on 24 Jan 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2023

**ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DU
CRYSPOVIRUS (CSPV-1) DANS LES ESPECES DE
CRYPTOSPORIDIUM QUI CIRCULENT CHEZ L'HOMME ET
LES RUMINANTS EN FRANCE**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 29 novembre 2023

par

Étienne, René, François CARVIN

sous la direction de

Karim ADJOU

JURY

Présidente du jury :	M^{me} Sophie LE PODER	Professeur à l'EnvA
Directeur de thèse :	M. Karim ADJOU	Professeur à l'EnvA
Examineur :	M. Bruno POLACK	Maître de Conférences à l'EnvA
Invitée :	M^{me} Nolwenn DHEILLY	Directrice de recherche à l'Institut Pasteur

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



Version juillet 2023

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

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	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
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	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	Tiret	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	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	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	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	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
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjés	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Béangère	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

À Mme Sophie Le Poder, Présidente du Jury de cette thèse, Professeur à l'EnvA,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse,

Hommage respectueux.

À M. Karim Adjou, directeur de cette thèse, Professeur à l'EnvA,
Pour votre confiance, votre gentillesse et votre disponibilité tout au long de l'élaboration de ce travail et pour m'avoir fait le grand honneur de me confier ce joli sujet,

Sincères remerciements.

À M. Bruno Polack, examinateur de cette thèse, Maître de conférences à l'EnvA,
Pour avoir accepté d'être l'examineur de cette thèse et pour tous vos conseils,

Tous mes remerciements.

À M^{me} Nolwenn Dheilly, invitée au Jury de cette thèse, Directrice de recherche à l'Institut Pasteur,
Pour avoir participé à ce projet et pour la réalisation des arbres phylogénétiques,

Tous mes remerciements

À Mme Aurélie Chevillot, technicienne au laboratoire de santé animale de l'Anses et membre de l'UMR Bipar

Pour m'avoir encadré dans mes premiers pas au laboratoire, pour tes conseils et ta gentillesse,

Sincères remerciements,

À M. Loïc Favennec et M. Damien Costa, du Centre national de référence des cryptosporidies, CHU Rouen-Normandie

Pour nous avoir confié les prélèvements humains, un matériel expérimental de grande qualité et d'une valeur inestimable,

Sincères remerciements

À ma famille, mes amis et tous ceux qui ont fait de moi ce que je suis.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	9
Première partie : bibliographie.....	11
1. Généralités sur <i>Cryptosporidium parvum</i>	11
A. <i>Historique et classification</i>	11
a. Découverte du genre.....	11
b. Classification taxonomique et phylogénétique.....	12
c. Espèces de <i>Cryptosporidium</i>	13
B. <i>Biologie de Cryptosporidium parvum</i>	16
a. Cycle parasitaire.....	16
b. Caractéristiques de l'oocyste.....	23
C. <i>Pathologie et pathogénie</i>	25
a. La cryptosporidiose des ruminants.....	25
b. La cryptosporidiose chez l'être humain.....	28
c. Tableau lésionnel.....	31
d. Pathogénie et physiopathologie.....	31
e. Diagnostic.....	32
f. Traitement.....	34
2. Généralités sur <i>Cryspovirus</i>	35
A. <i>Historique et classification</i>	35
a. Découverte.....	35
b. Classification.....	36
B. <i>Biologie de CSpV-1</i>	37
a. Caractéristiques du virion.....	37
b. Transmission de CSpV-1.....	40
c. Effet sur l'hôte.....	40
C. <i>Épidémiologie de CSpV-1</i>	41
a. Épidémiologie descriptive.....	41
b. Epidémiologie moléculaire.....	41
Deuxième partie : étude expérimentale.....	44
1. Introduction.....	44
2. Matériels et méthodes.....	44
A. <i>Recherche et typage de Cryptosporidium</i>	44
a. PCR 18S.....	44
b. RFLP.....	45
c. PCR GP60.....	47
B. <i>Recherche du génome de CSpV-1</i>	48
a. Purification par IMS.....	48
b. Extraction d'ARN et transcription inverse.....	48
c. PCR.....	49
d. qPCR.....	53
C. <i>Analyse génomique des séquences de CSpV-1</i>	53
3. Résultats.....	54
A. <i>Recherche et typage de Cryptosporidium</i>	54

<i>B. Recherche du génome de CSpV-1</i>	57
<i>C. Résultats de l'analyse génomique des séquences CPVS et CPVL</i>	57
4. Discussion.....	60
<i>A. Identification de CSpV-1 en France chez l'homme</i>	60
<i>B. Analyse épidémiologique</i>	60
a. Circulation des sous-types de <i>Cryptosporidium</i> chez l'homme et les ruminants en France	60
b. Circulation du <i>Cryspovirus</i> chez les cryptosporidies isolées chez l'homme et les ruminants en France.....	61
c. Relation entre présence du virus et pathogénicité du parasite : perspectives.....	61
Conclusion	63
Liste des références bibliographiques	65
Annexe 1 : protocole d'immunofluorescence directe	71
Annexe 2 : protocole d'extraction d'ADN	73
Annexe 3 : protocole de PCR 18S	75
Annexe 4 : protocole de RFLP	79
Annexe 5 : protocole de PCR GP60	81
Annexe 6 : protocole d'IMS	85
Annexe 7 : protocole d'extraction d'ARN et de RT-PCR	89
Annexe 8 : protocole de qPCR	97
Annexe 9 : tableaux des résultats des manipulations	99

Liste des figures

Figure 1 – Arbre phylogénétique de 28 espèces de cryptosporidies obtenu par séquençage de la petite sous-unité des ARN ribosomiaux (ARNr 18S) (Šlapeta, 2013)	15
Figure 2 – Localisation de <i>C. parvum</i> dans la bordure en brosse des entérocytes (Euzéby, 2008)	16
Figure 3 – Cycle oro-fécal de <i>Cryptosporidium</i> spp. (Centers for Disease Control, 2019).....	16
Figure 4 – Cycle parasitaire de <i>C. parvum</i> dans l'intestin grêle des mammifères (Dhal <i>et al.</i> , 2022)	17
Figure 5 – Images de la phase de dékystement de <i>C. parvum</i> obtenues au microscope électronique à balayage (a) et au microscope optique (b) (d'après Smith <i>et al.</i> , 2005)	17
Figure 6 – Image au microscope électronique à transmission d'un trophozoïte de <i>C. parvum</i> dans la bordure en brosse d'un entérocyte (The Korean Society for Parasitology, 2003).....	18
Figure 7 - Image d'un méronte de type I de <i>C.parvum</i> au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)	18
Figure 8 - Image d'un mérozoïte de <i>C. parvum</i> obtenue au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)	19
Figure 9 – Image de macrogamonte de <i>C. parvum</i> obtenue au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)	19
Figure 10 – Image de microgamonte de <i>C. parvum</i> obtenue au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)	20
Figure 11 – Zygote de <i>C. parvum</i> en cours de différenciation en oocyste (The Korean Society for Parasitology, 2003)	20
Figure 12 – Oocyste de <i>C. parvum</i> libéré dans les matières fécales (coloration de Ziehl-Nielsen modifiée) (The Korean Society for Parasitology, 2003).....	21
Figure 13 – Formation de la membrane parasitophore de <i>C. muris</i> (microscope électronique à balayage) (Valigurová <i>et al.</i> , 2008).....	22
Figure 14 – Schéma représentant les différentes étapes de l'invasion de la cellule-hôte par <i>C. parvum</i>	22
Figure 15 - Modèle de la paroi de l'oocyste de <i>C. parvum</i> (Jenkins <i>et al.</i> , 2010)	23
Figure 16 - Prévalence de l'excrétion d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez le veau en fonction de l'âge (adapté de Santín <i>et al.</i> , 2008).....	25
Figure 17 – Aspect de la diarrhée chez un chevreau atteint de cryptosporidiose (Ghecham, 2012 <i>in Vétofocus</i>).....	27

Figure 18 - Aspect de la diarrhée chez un veau mort de cryptosporidiose (Chartier et Paraud, 2010).....	27
Figure 19 - Prévalence nationale de la cryptosporidiose en fonction des catégories de population (Dong <i>et al.</i> , 2020).....	29
Figure 20 - Exemple de test rapide permettant le dépistage sur le terrain de l'excrétion d'oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	32
Figure 21 - Formules chimiques du lactate d'halofuginone (a) et de la paromomycine (b) (National Institute for Health, 2023a, 2023b)	34
Figure 22 - Formule chimique du nitazoxanide (National Institute for Health, 2023c).....	34
Figure 23 - Électronographie de sporozoïtes de <i>C. parvum</i> après hybridation <i>in situ</i> avec de l'ADNc marqué élaboré à partir des séquences d'ARN viral (Khramtsov <i>et al.</i> , 1997)	35
Figure 24 - Aspect typique d'un virion de <i>Partitiviridae</i> (Hulo <i>et al.</i> , 2011; Vainio <i>et al.</i> , 2018)	37
Figure 25 - Organisation génomique de CSpV-1 (Nibert <i>et al.</i> , 2009)	38
Figure 26 - Arbres phylogénétiques des deux fragments d'ARN des <i>Partitiviridae</i> (groupe externe : picobirnavirus humain) (Nibert <i>et al.</i> , 2009)	40
Figure 27 - Arbre phylogénétique de CSpV-1 construit grâce à la séquence de dsRNA1 (Adjou <i>et al.</i> , 2023)	41
Figure 28 - Arbre phylogénétique de CSpV-1 construit à partir de la séquence de dsRNA2 (Adjou <i>et al.</i> , 2023)	42
Figure 29 - Exemple de gel obtenu après PCR 18S	45
Figure 30 - Exemple de gel obtenu après RFLP	46
Figure 31 - Exemple de gel obtenu après PCR GP60	48
Figure 32 - Exemple de gel obtenu après PCR CP.....	49
Figure 33 - Exemple de gel obtenu après PCR RdRp	50
Figure 34 - Exemple de gel obtenu après PCR CPVL	51
Figure 35 - Exemple de gel obtenu après PCR CPVS	52
Figure 36 – Résultats du génotypage des échantillons humains	55
Figure 37 – Carte épidémiologique des différents génotypes de <i>Cryptosporidium</i> identifiés dans les échantillons d'origine humaine	56
Figure 38 – Arbre phylogénétique construit à partir des séquences CPVS	58
Figure 39 – Arbre phylogénétique construit à partir des séquences CPVL	59

Liste des tableaux

Tableau 1 - Classification taxonomique ancienne de <i>C. parvum</i> (Chermette et Boufassa-Ouzrout, 1988 ; d'après Levine, 1984)	12
Tableau 2 – Classification taxonomique du genre <i>Cryptosporidium</i> (Euzéby, 2008; ITIS, 2013; Lecointre <i>et al.</i> , 2016; Manent, 2014; O'Donoghue, 1995).....	13
Tableau 3 – Espèces du genre <i>Cryptosporidium</i> valides selon l'ICZN (Fayer, 2010; Manent, 2014; Šlapeta, 2013; Xiao <i>et al.</i> , 2004; Zahedi et Ryan, 2020).....	14
Tableau 4 – Procédures de désinfection réputées efficaces contre <i>C. parvum</i> (d'après O'Donoghue, 1995)	24
Tableau 5 - Prévalence des infections à <i>Cryptosporidium</i> dans différentes populations en fonction du revenu médian dans le pays (Dong <i>et al.</i> , 2020).....	28
Tableau 6 - Exemples de kit commerciaux permettant le dépistage de <i>C. parvum</i> en laboratoire (Leitch et He, 2011)	33
Tableau 7 - Classification ICTV de CSpV-1	36
Tableau 8 - Comparaison des caractéristiques principales des <i>Partitiviridae</i> et de CSpV-1 (d'après Khramtsov <i>et al.</i> , 1997 ; Khramtsov et Upton, 2000 ; Khramtsov <i>et al.</i> , 2000 ; Nibert <i>et al.</i> , 2009 ; Vainio <i>et al.</i> , 2018)	39
Tableau 9 - Résultats des analyses de biologie moléculaire visant à rechercher et typer <i>Cryptosporidium</i> chez les ruminants.....	54
Tableau 10 - Résultats des PCR visant à détecter la présence de CSpV-1	57

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARN : acide ribonucléique

BEt : bromure d'éthidium

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

C. parvum : *Cryptosporidium parvum*

CDC : *Centers for Disease Control* (Centres américains de contrôle des maladies)

CHU : Centre hospitalier universitaire

CNR : Centre national de référence

CP : *Coat Protein* (protéine de capsid)

CSpV-1 : *Cryptosporidium parvum virus 1*

dsRNA : *double-strand RNA* (ARN bicaténaire)

EIA : *Enzyme ImmunoAssay* (technique immunoenzymatique)

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (technique d'immunoabsorption par enzyme liée)

EMA : *European Medicine Agency* (Agence européenne du médicament)

FDA : *Food and Drug Agency* (Agence américaine de l'alimentation et du médicament)

GENN : gastroentérite néonatale

I² : hétérogénéité statistique

IC95 : intervalle de confiance à 95 %

ICTV : *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comité international de taxonomie des virus)

ICZN : *International Commission on Zoological Nomenclature* (Commission internationale de nomenclature zoologique)

ID₅₀ : dose infectieuse à 50 %

IF : immunofluorescence

IMS : *ImmunoMagnetic separation* (séparation immunomagnétique)

NCBI : *National Center for Biotechnology Information* (centre national américain pour l'information biotechnologique)

ND : nom déposé

PBS : *Phosphate buffured saline* (tampon phosphate salin)

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction en chaîne de polymérase)

qPCR : PCR quantitative

RCP : résumé des caractéristiques du produit

RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

RT : *Reverse Transcription* (transcription inverse)

RdRp : *RNA-dependant RNA polymerase* (ARN polymérase ARN-dépendante)

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

TAE : Tris, acétate, EDTA

UMR : unité mixte de recherche

Introduction

Cryptosporidium parvum est un protozoaire parasite Apicomplexa découvert en 1912 par l'Américain Ernest Edward Tyzzer. Il est retrouvé chez de très nombreuses espèces et sa distribution géographique est ubiquitaire. À ce jour, il existe 46 espèces de *Cryptosporidium*, et plus de 120 génotypes qui seront potentiellement reconnus comme espèces valides dans les années à venir.

C. parvum est à l'origine d'entérites ayant une importance majeure chez les ruminants nouveau-nés. Le parasite est un des agents étiologiques du complexe des gastroentérites néonatales, dont l'importance économique est majeure en raison de la morbidité et de la mortalité constatées.

Le potentiel zoonotique de *C. parvum* a longtemps été négligé et ce n'est qu'à partir des années 1980 avec l'émergence du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) en médecine humaine que les premières études de transmissibilité à l'Homme ont été menées.

L'épidémiologie de la cryptosporidiose est complexe, notamment en raison des modes de transmission variés. Le parasite est principalement transmis par voie oro-fécale zoonotique ou anthropique mais peut également être transmise par l'eau ou les aliments. Ce parasite a été observé comme pathogène affectant les humains et de multiples espèces d'animaux, et ayant comme conséquence une gastroentérite aiguë, des douleurs abdominales et de la diarrhée. L'importance de cette infection a été mise en avant dans les années 80, avec l'apparition du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ce parasite est à l'origine d'épidémies importantes de gastroentérite, notamment lorsque des oocystes sont présents dans l'eau de boisson, pouvant alors causer des épidémies majeures, comme celle de Milwaukee (Wisconsin) aux Etats-Unis qui fut la plus importante épidémie d'origine hydrique jamais enregistrée, touchant 403 000 personnes. C'est après cette épidémie majeure que *Cryptosporidium* a été reconnu comme un problème de santé publique. La cryptosporidiose est à l'origine de diarrhées sévères pouvant être dangereuse chez les patients immunodéprimés, mais présente une guérison spontanée chez les individus immunocompétents.

Dans les élevages de ruminants, la cryptosporidiose est à l'origine de perte économique, découlant de la diminution du poids des carcasses et des coûts de traitement engagé pour soutenir les nouveaux-nés atteints. Les possibilités thérapeutiques sont encore très restreintes aujourd'hui, mais de nombreuses études ont été menées pour trouver un agent thérapeutique efficace, que ce soit en santé humaine mais également pour prévenir et lutter contre la parasitose chez l'animal, notamment chez les animaux de production. La grande résistance de l'oocyste de *Cryptosporidium* que ce soit dans l'environnement mais également dans l'organisme rend difficile la mise au point de moyens de lutte pleinement efficaces.

En 2009, Nibert *et al.* rendent compte de la découverte par Khramtsov *et al.* en 1997 d'un nouveau genre de virus infectant *C. parvum* et le nomment *Cryspovirus*. L'ICTV (*International Committee on Taxonomy of viruses*) l'attribue à la famille des *Partitiviridae* qui regroupe des virus à ARN double brin segmenté, à virion non-enveloppé et infectant principalement des plantes et des champignons. L'espèce-type du genre est le CSpV-1.

L'effet de l'infection de *C. parvum* par le CSpV-1 est actuellement peu clair, de même que sa répartition dans les lignées de cryptosporidies, aussi, l'objet de ce manuscrit sera, après une étude bibliographique retraçant les principales caractéristiques de *C. parvum* et de *Cryspovirus*, de proposer de mettre en évidence la présence de CSpV-1 dans des échantillons de matières fécales recueillis sur le terrain ainsi qu'une analyse épidémiologique des clades de *Cryspovirus* circulant chez l'homme et les ruminants en France.

Première partie : bibliographie

1. Généralités sur *Cryptosporidium parvum*

A. Historique et classification

a. Découverte du genre

Le genre *Cryptosporidium* fut décrit pour la première fois par l'Américain Ernest Edward Tyzzer en 1907. Il isola un protozoaire dans les glandes gastriques de ses souris de laboratoire et retrouva des oocystes dans leur fèces. Il nomma sa découverte *Cryptosporidium muris*, et la proposa comme espèce prototype du genre. En 1912, il mit en évidence, à nouveau chez la souris, une nouvelle espèce du genre, *Cryptosporidium parvum*, retrouvée cette fois-ci dans l'intestin grêle. Ces découvertes restèrent sans grand impact pendant plusieurs décennies (Fayer, 2004; Tyzzer, 1907).

En 1955, Slavin décrit *Cryptosporidium meleagridis* chez la dinde, qui avait déjà été observé chez la poule d'après des travaux de Tyzzer datant de 1929. Cette découverte relance l'intérêt pour les recherches impulsées par Tyzzer et en 1971, le genre *Cryptosporidium* est associé aux diarrhées bovines, particulièrement chez le jeune animal (Panciera *et al.*, 1971; Slavin, 1955).

Les deux premiers cas humains de cryptosporidiose sont décrits en 1976 chez des individus immunodéprimés (Meisel *et al.*, 1976; Nime *et al.*, 1976). Il faudra néanmoins attendre 1982 et les premiers effets de l'épidémie de SIDA pour que les CDC (*Centers for Disease Control*) américains émettent un rapport sur la transmission à l'humain (Centers for Disease Control, 1982).

La communauté scientifique vouera à partir de cet instant un intérêt croissant pour le genre *Cryptosporidium*, dans les années qui suivent, la cryptosporidiose est décrite dans de très nombreuses espèces de reptiles et de mammifères (Fayer, 2004).

b. Classification taxonomique et phylogénétique

En classification phylogénétique moderne, le genre *Cryptosporidium* est rattaché au phylum des *Apicomplexa* au sein des eucaryotes. Avant les apports de la biologie moléculaire, il était de coutume d'apparenter les cryptosporidies aux coccidies en raison de similitudes entre leurs cycles parasitaires (Tableau 1) (Levine, 1984).

Tableau 1 - Classification taxonomique ancienne de *C. parvum* (Chermette et Boufassa-Ouzrout, 1988 ; d'après Levine, 1984)

Classification	
Sous-règne	Protozoa
Embranchement	Apicomplexa
Classe	Sporozoea
Sous-classe	Coccidia
Ordre	Eucoccidiida
Sous-ordre	Eimeriina
Famille	<i>Cryptosporidiidae</i>
Genre	<i>Cryptosporidium</i>

Le tableau suivant indique la classification phylogénétique moderne du genre *Cryptosporidium*.

Tableau 2 – Classification taxonomique du genre *Cryptosporidium* (Euzéby, 2008; ITIS, 2013; Lecointre et al., 2016; O'Donoghue, 1995)

Classification		Caractères dérivés propres
Domaine	Eukaryota	- Cellule dont le contenu est divisé en zones à fonction bien définie (noyau, mitochondries, etc.). Multiplication par mitose.
Sous-domaine	Bikonta	- Deux flagelles insérés aux pôles opposés
Règne	Chromalveolata	- Séquences des ARN 16S et 23S
Sous-règne	Clade SAR	- Séquences des ARN 16S et 23S
Division	Alveolata	- Séquences des ARN 16S et 23S - Présence d'un réseau de vésicules sous-membranaires aplaties, les alvéoles
Embranchement	Apicomplexa	- Parasites intracellulaires ou endosymbionte - Existence d'une forme infectieuse dite sporozoïte - Centrioles composés de neuf singlets de microtubules - Un des pôles de la cellule est muni d'un complexe apical composés d'organites spécialisés, dont le conoïde
Classe	Sporozoasida	- Reproduction sexuée et asexuée - Production d'oocystes
Sous-classe	Coccidiasina	- Cycle comprenant généralement des stades de mérogonie, gaméto gonie et sporogonie - Gamontes de petite taille
Ordre	Eucoccidiorida	- Présence des stades mérogonie et schizogonie
Sous-ordre	Eimeriorina	- Développement indépendant des macrogamontes et des microgamontes - Zygote amotile
Famille	Cryptosporidiidae	- Oocyste contenant quatre sporozoïtes nus (pas de sporocystes) - Cycle monoxène - Stades endogènes avec organite d'attachement
Genre	<i>Cryptosporidium</i>	- Développement extracytoplasmique dans la bordure en brosse des entérocytes - Microgamètes non-flagellés - Absence de spécificité d'espèce - Très grande prolificité

c. Espèces de *Cryptosporidium*

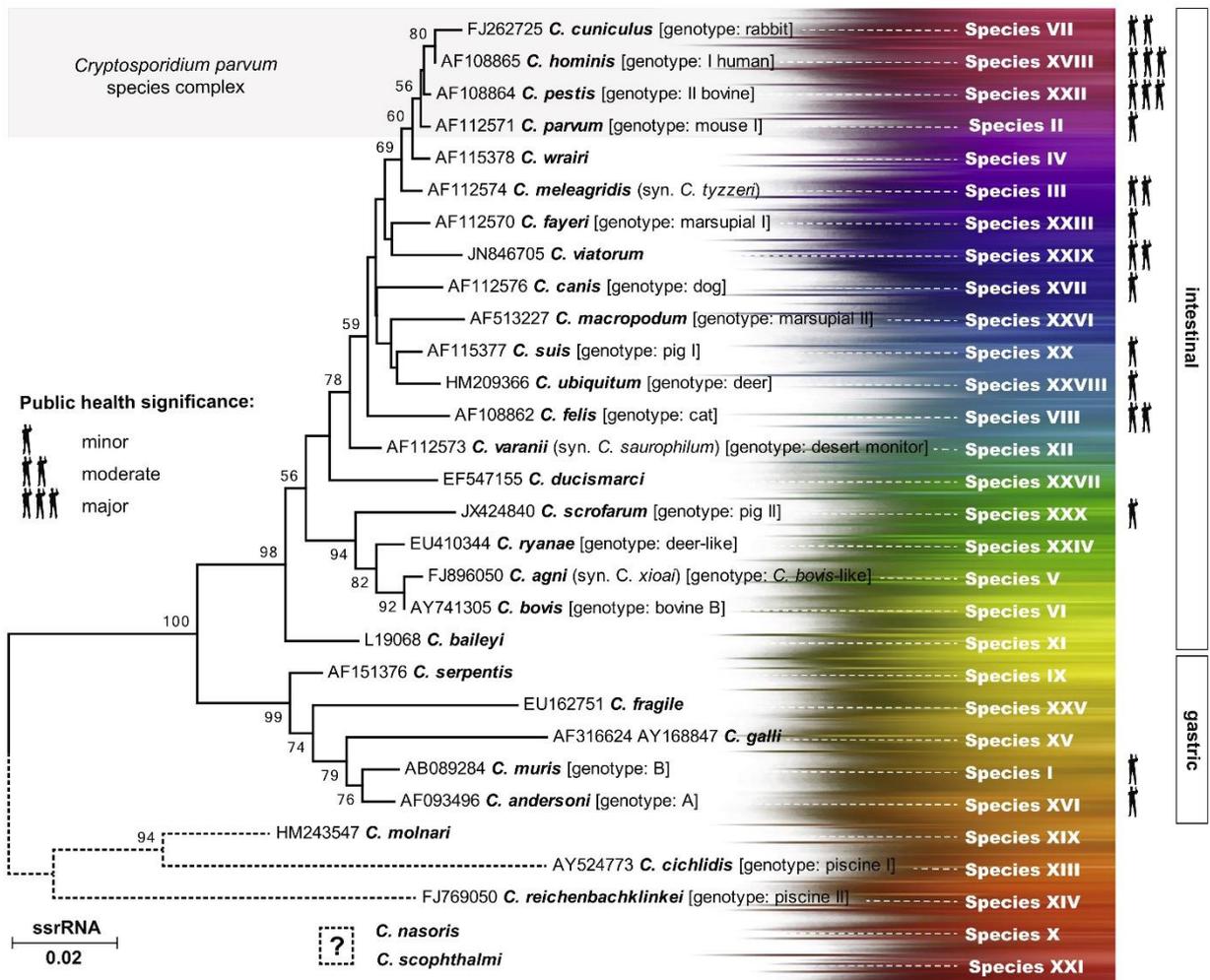
46 espèces validées par l'ICZN (*International Commission on Zoological Nomenclature*) sont recensées à ce jour au sein du genre *Cryptosporidium* (Zahedi et Ryan, 2020), il faut également ajouter que plus de 120 génotypes sont en attente de validation. Le tableau suivant récapitule les différentes espèces du genre *Cryptosporidium* ainsi que leurs différents hôtes et leur localisation de prédilection.

Tableau 3 – Espèces du genre *Cryptosporidium* valides selon l'ICZN (Fayer, 2010; Manent, 2014; Šlapeta, 2013; Xiao et al., 2004; Zahedi et Ryan, 2020)

Espèce	Hôtes majeurs	Hôtes mineurs	Localisation chez l'hôte
<i>Cryptosporidium muris</i>	Rongeurs, chameaux de Bactriane	Homme, daman du Cap, chèvre des montagnes rocheuses	Estomac
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Bovins, ovins, caprins, Homme	Cervidés, souris, campagnols, porcins	Intestin
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Dinde, Homme	Perroquets	Intestin
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Cochons d'Inde	-	Intestin
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Bovins	-	Inconnue
<i>Cryptosporidium cuniculus</i>	Lapins	Homme	Intestin
<i>Cryptosporidium felis</i>	Chats domestiques	-	Intestin
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Ophidiens, lacertiliens	-	Estomac
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Poules, dindes	Autruches, cailles, canards, perruches	Intestin
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Lacertiliens	Ophidiens	Estomac
<i>Cryptosporidium galli</i>	Passereaux, poules, tétras	-	Proventricule
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovins, chameaux de Bactriane	Ovins	Abomasum
<i>Cryptosporidium canis</i>	Chiens	Homme	Intestin
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Hommes, singes	Dugongs, ovins	Intestin
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Poissons	-	Estomac
<i>Cryptosporidium suis</i>	Porcins	-	Intestin
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Poissons (turbot)	-	Intestin
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Kangourous	-	Inconnue
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Bovins	-	Inconnue
<i>Cryptosporidium fragile</i>	Reptiles	-	Estomac
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Kangourou	-	Inconnue
<i>Cryptosporidium ducismarci</i>	Tortues terrestres	-	Intestin
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	Mammifères	-	Inconnue
<i>Cryptosporidium viatorum</i>	Homme	-	Inconnue
<i>Cryptosporidium scrofarum</i>	Porcs et sangliers	-	Intestin
<i>Cryptosporidium ornithophilus</i>	Autruche	-	-
<i>Cryptosporidium bollandi</i>	Scalaire commun et Oscar	-	-
<i>Cryptosporidium proventriculi</i>	Colopsitte	-	Proventricule
<i>Cryptosporidium microti</i>	Campagnol des champs	-	-
<i>Cryptosporidium alticolis</i>	Campagnol des champs	-	-
<i>Cryptosporidium apodemi</i>	Mulot rayé	-	-
<i>Cryptosporidium ditrichi</i>	Mulot à collier	-	-
<i>Cryptosporidium occultus</i>	Rat brun	-	-
<i>Cryptosporidium homai</i>	Cobaye	-	-
<i>Cryptosporidium testudinis</i>	Tortue russe	-	-
<i>Cryptosporidium avium</i>	Perruche de Sparman	-	-
<i>Cryptosporidium proliferans</i>	Rat-taube d'Afrique de l'Est	-	-
<i>Cryptosporidium rubeyi</i>	Spermophile de Californie	-	-
<i>Cryptosporidium huwi</i>	Guppy, néon tétra, barbu de Sumatra	-	-
<i>Cryptosporidium erinacei</i>	Hérisson d'Europe	-	-
<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	Souris commune	-	-
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Mouton	-	-

L'arbre suivant retrace la proximité entre les génomes des différentes espèces de cryptosporidies.

Figure 1 – Arbre phylogénétique de 28 espèces de cryptosporidies obtenu par séquençage de la petite sous-unité des ARN ribosomaux (ARNr 18S) (Šlapeta, 2013)



B. Biologie de *Cryptosporidium parvum*

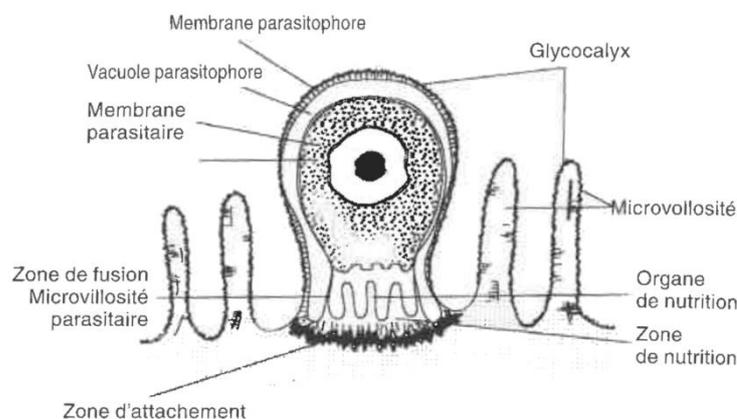
a. Cycle parasitaire

- *Caractéristiques*

La totalité des espèces du genre *Cryptosporidium* et, *a fortiori*, *C. parvum* est parasite intracellulaire obligatoire (Fayer, 2004).

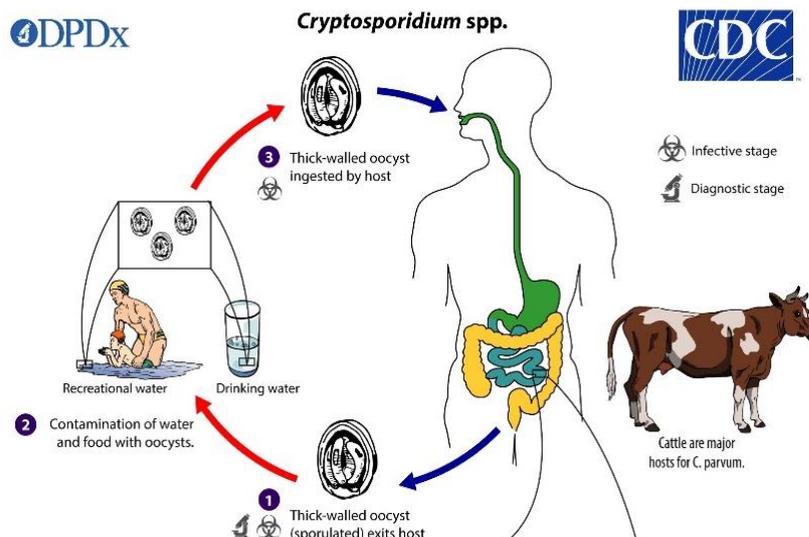
C. parvum présente un développement épicyttaire, il se localise dans la bordure en brosse des entérocytes (Figure 2). Des localisations extra-intestinales sont ponctuellement décrites chez des individus immunodéprimés (épithélium respiratoire, voies biliaires, canaux pancréatiques, etc.) (Fayer, 2004).

Figure 2 – Localisation de *C. parvum* dans la bordure en brosse des entérocytes (Euzéby, 2008)



Le cycle de *C. parvum* débute par l'ingestion d'ocystes, seul stade infectieux et retrouvé dans l'environnement. La transmission est exclusivement oro-fécale (figure 3).

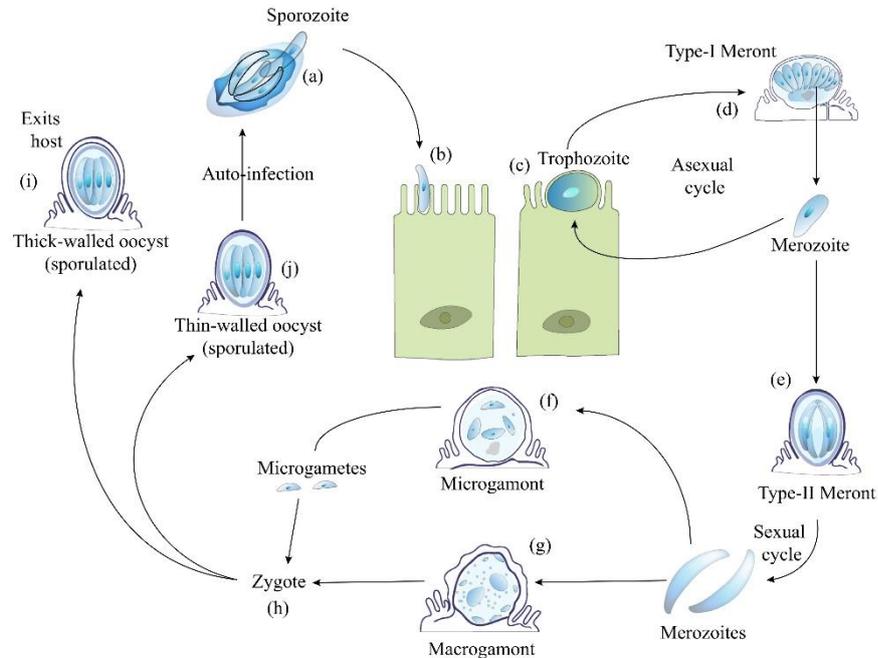
Figure 3 – Cycle oro-fécal de *Cryptosporidium* spp. (Centers for Disease Control, 2019)



Le cycle parasitaire est monoxène, c'est-à-dire qu'il ne fait intervenir qu'un hôte définitif au sein duquel la totalité des étapes est réalisée. La période pré-patente est en moyenne de trois à cinq jours entre l'ingestion et l'excrétion d'oocystes (Fayer, 2004; O'Donoghue, 1995).

Après l'ingestion, l'infection fait intervenir différents stades décrits ci-dessous.

Figure 4 – Cycle parasitaire de *C. parvum* dans l'intestin grêle des mammifères (Dhal et al., 2022)

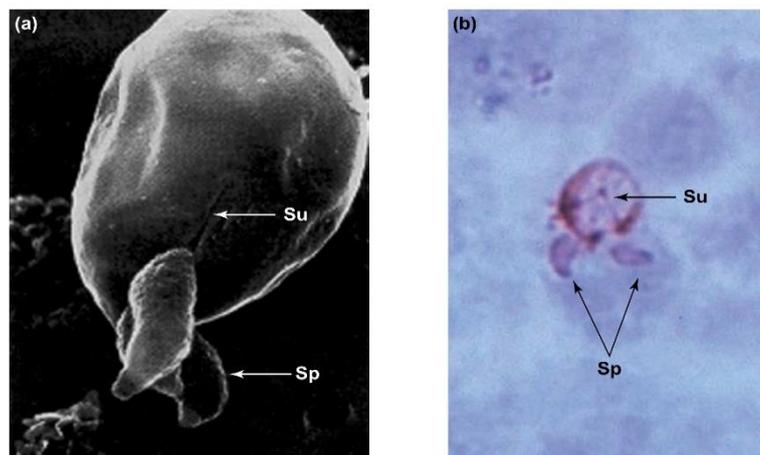


- *Déroulement du cycle*

- Dékystement

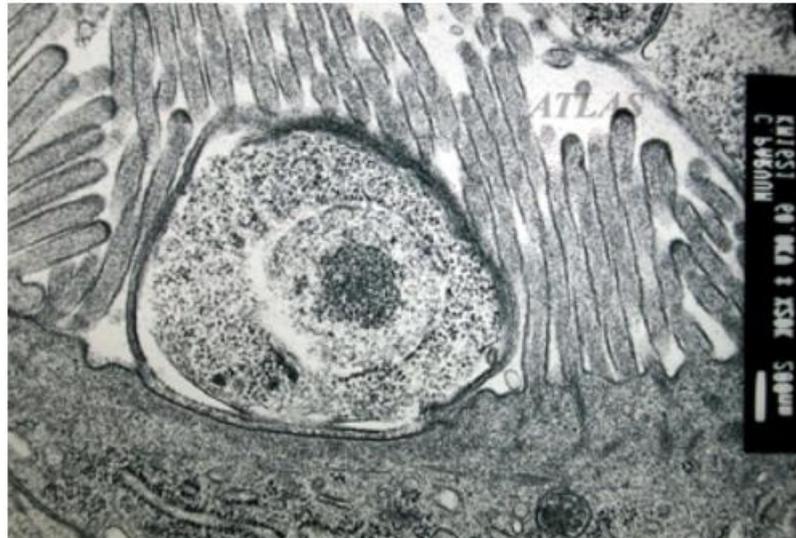
Sous l'effet des conditions physico-chimiques, la paroi de l'oocyste est dégradée dans l'iléon et libère quatre sporozoïtes nus. Il s'agit de l'étape *d'excystation* ou de dékystement (Figure 5) (Dhal et al., 2022).

Figure 5 – Images de la phase de dékystement de *C. parvum* obtenues au microscope électronique à balayage (a) et au microscope optique (b) (d'après Smith et al., 2005)



Les sporozoïtes vont ensuite s'attacher à la bordure en brosse des entérocytes et former un trophozoïte (Figure 6) Figure 6 – Image au microscope électronique à transmission d'un trophozoïte de *C. parvum* dans la bordure en brosse d'un entérocyte (The Korean Society for Parasitology, 2003). Le trophozoïte est uni à la cellule (position intracellulaire) par une zone d'attachement et de nutrition (position extra-cytoplasmique), formant une vacuole parasitophore (O'Donoghue, 1995).

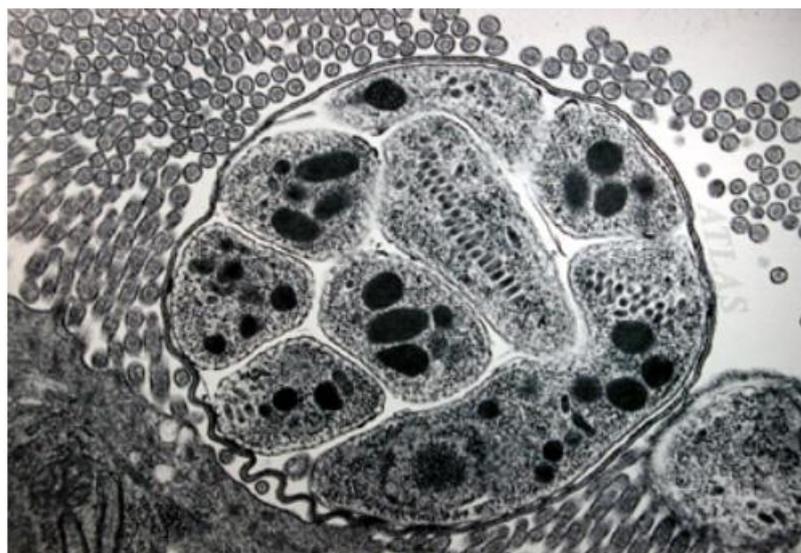
Figure 6 – Image au microscope électronique à transmission d'un trophozoïte de *C. parvum* dans la bordure en brosse d'un entérocyte (The Korean Society for Parasitology, 2003)



□ Mérogonie

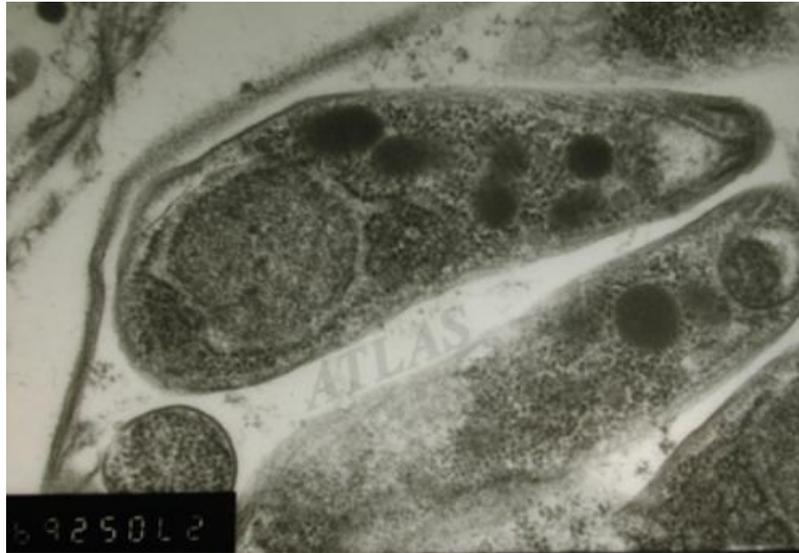
Le trophozoïte subit ensuite une première phase de reproduction asexuée appelée mérogonie. Il se transforme ainsi en méroonte de type I, qui contient huit mérozoïtes de première génération (Figure 7). La rupture du méroonte libère ces mérozoïtes dans la lumière de l'intestin.

Figure 7 - Image d'un méroonte de type I de *C. parvum* au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)



Les mérozoïtes (Figure 8) libérés infectent les cellules voisines et ont deux devenir possibles, soit ils forment de nouveaux trophozoïtes en initiant un cycle réinfectieux, soit ils forment des mérontes de type II contenant quatre mérozoïtes de seconde génération. Une étude récente indique que ces mérozoïtes de seconde génération seraient eux aussi capable d'initier une nouvelle mérogonie en formant à nouveau des trophozoïtes (English *et al.*, 2022).

Figure 8 - Image d'un mérozoïte de *C. parvum* obtenue au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)



□ Gamétogonie

La libération des mérozoïtes de seconde génération débute la phase sexuelle du cycle parasitaire. Ceux-ci vont infecter les cellules voisines à l'image des mérozoïtes de première génération, mais vont quant à eux se différencier en microgamontes mâles (Figure 10) et en macrogamontes femelles (Figure 9) (O'Donoghue, 1995). Aucun mécanisme expliquant la différenciation en gamètes mâles ou femelles n'est à ce jour expliqué.

Figure 9 – Image de macrogamonte de *C. parvum* obtenue au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)

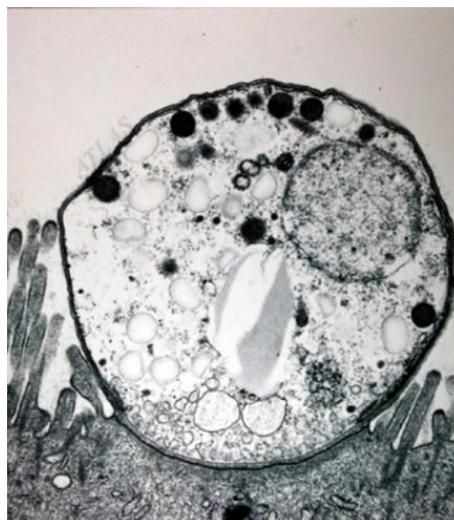
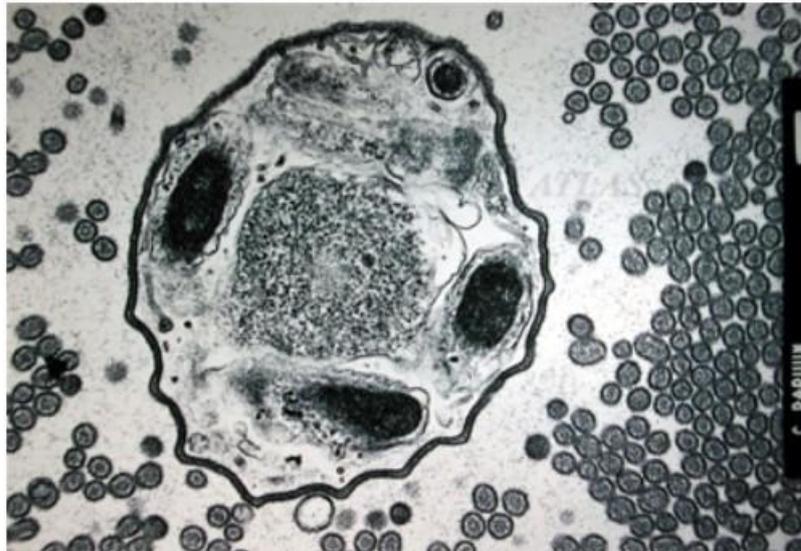


Figure 10 – Image de microgamonte de *C. parvum* obtenue au microscope électronique à transmission (The Korean Society for Parasitology, 2003)



Les microgamontes produisent seize microgamètes non-flagellés chacun, ceux-ci sont libérés à maturité dans la lumière intestinale. Ils pénètrent alors dans les macrogamontes, les fécondent et forment un zygote (Chalmers et Davies, 2010).

□ Sporogonie

Le zygote diploïde subit deux divisions de méiose pour se différencier en quatre sporozoïtes haploïdes nus. La vésicule parasitophore mature et se transforme en oocyste, soit à paroi épaisse, soit à paroi mince (Figure 11). Les oocystes se détachent de la paroi intestinale et ont deux devenir possibles. Les oocystes à paroi épaisse sont excrétés dans les matières fécales (figure 12) et peuvent immédiatement infecter un nouvel hôte ; les oocystes à paroi mince sont dékystés et réinfectent le même hôte, on parle d'auto-infection. (Chalmers et Davies, 2010; Dhal *et al.*, 2022; O'Donoghue, 1995)

Figure 11 – Zygote de *C. parvum* en cours de différenciation en oocyste (The Korean Society for Parasitology, 2003)

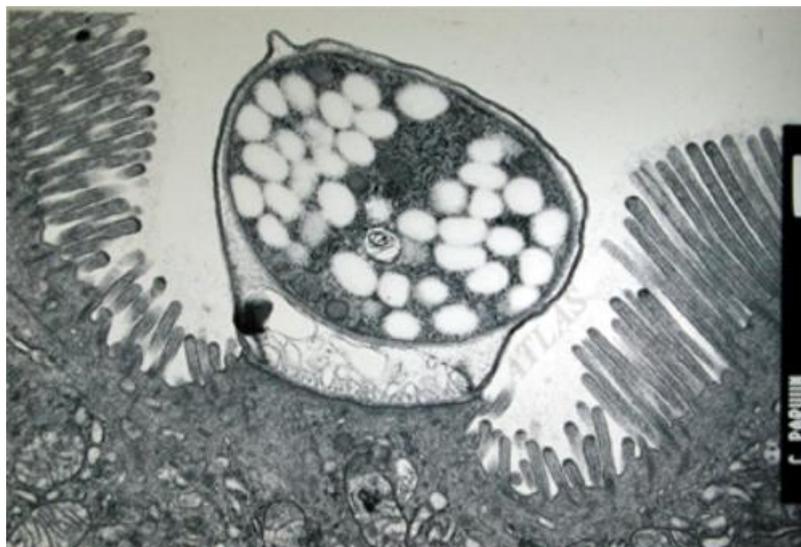
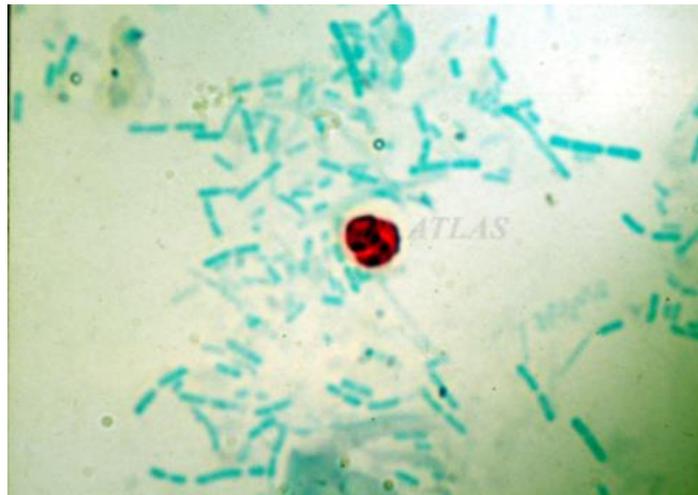


Figure 12 – Oocyste de *C. parvum* libéré dans les matières fécales (coloration de Ziehl-Nielsen modifiée) (The Korean Society for Parasitology, 2003)



- *Particularités du cycle*

L'originalité du cycle de *C. parvum* est qu'il permet la réinfection de l'hôte via les mérozoïtes de première génération se différenciant en trophozoïtes et l'auto-infection grâce à la production d'oocystes à paroi mince se dékystant immédiatement. Environ 20 % des oocystes présentent une paroi mince. Ces particularités expliquent le caractère parfois chronique de la cryptosporidiose, l'excrétion massive d'oocystes et la difficulté à éliminer le parasite. (Fayer et Xiao, 2008; Xiao *et al.*, 2015)

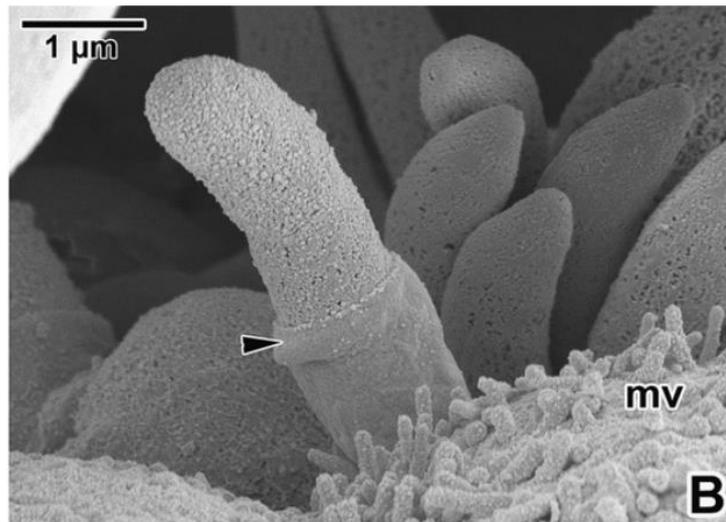
- *Position dans la cellule-hôte*

La position du parasite dans sa cellule-hôte est tout à fait particulière, en effet, il se localise dans une vésicule parasitophore qui provient à la fois du parasite et de la cellule-hôte. Seule cette vésicule est en contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte, ce qui donne au parasite une localisation unique : intracellulaire mais extracytoplasmique. Valigurová *et al.* (2008) suggèrent le terme « épicytellaire ».

L'attachement à la cellule-hôte et l'invasion se fait, comme chez la plupart des Apicomplexa, grâce au complexe apical. Cet ensemble d'organites est composé d'un anneau apical, d'un conoïde et d'organites sécrétoires (une rhoptrie unique et des micronèmes) (Cacciò et Widmer, 2014).

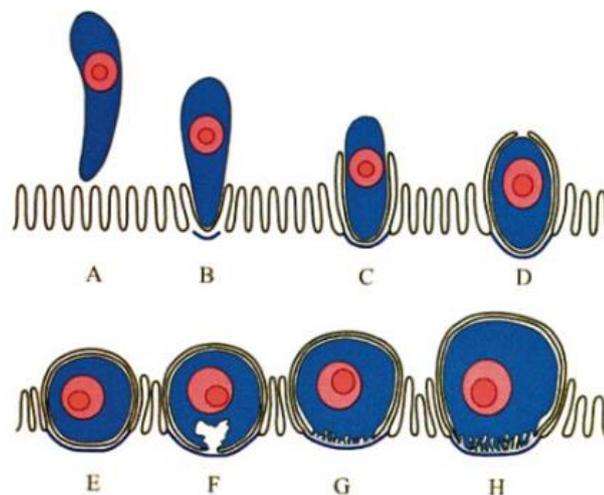
Lors du contact entre le zoïte (sporozoïte ou mérozoïte) et la cellule-hôte, la rhoptrie s'étend jusqu'au site d'attachement et les micronèmes se déplacent en région apicale. Le contenu des organites sécrétoires est alors libéré, ce qui induit l'attachement, l'invasion de la cellule-hôte et la formation de la vésicule parasitophore. Cette vésicule parasitophore est constituée de replis de la membrane de la cellule-hôte qui perd sa nature microvillieuse lors de l'attachement et des protéines exprimées à la surface du zoïte (Figure 13) (Valigurová *et al.*, 2008).

Figure 13 – Formation de la membrane parasitophore de *C. muris* (microscope électronique à balayage) (Valigurová *et al.*, 2008)



Après l'attachement à la cellule-hôte et l'encapsulation dans la membrane parasitophore, des mécanismes complexes sont mis en œuvre à l'interface entre le pôle apical de la cellule-hôte et le parasite (Cacciò et Widmer, 2014). Les membranes de la cellule-hôte et du parasite sont fortement modifiées au point de contact et un organite de nutrition se forme à la base du parasite (Umemiya *et al.*, 2005). Le schéma suivant résume les étapes de l'invasion de la cellule-hôte.

Figure 14 – Schéma représentant les différentes étapes de l'invasion de la cellule-hôte par *C. parvum*. Le contact entre la cellule-hôte et le zoïte (A-B) mène à une modification de la membrane cellulaire (C-D) qui encapsule le parasite (E) ; un organite de nutrition est ensuite formé à l'interface entre le parasite et la cellule-hôte (F-H) (Umemiya *et al.*, 2005)



La localisation unique et très protégée des cryptosporidies chez l'hôte serait à l'origine de leur forte résistance aux traitements, l'organe de nutrition serait notamment en mesure de bloquer l'entrée de molécules anti-parasitaires, ce qui altérerait grandement leur efficacité (O'Donoghue, 1995).

b. Caractéristiques de l'oocyste

L'oocyste est le seul stade parasitaire retrouvé dans l'environnement, ceux-ci sont à l'origine de l'infection de nouveaux hôtes. Ils présentent une très grande résistance dans le milieu extérieur. En médecine vétérinaire et humaine, l'observation d'oocystes dans les matières fécales par coproscopie est le moyen diagnostique le plus communément utilisé (Gerace *et al.*, 2019).

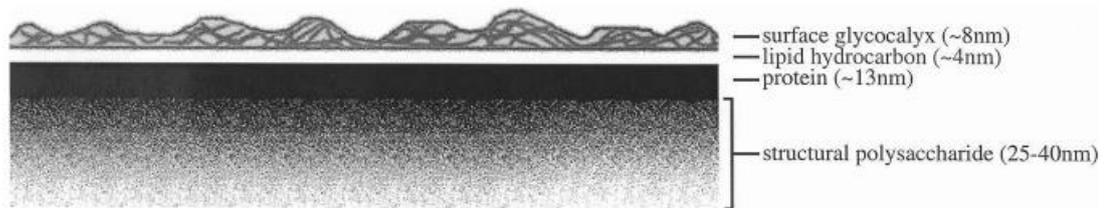
- *Structure*

Les oocystes de *C. parvum* ont une forme sphérique, présentent un diamètre de 3 à 5 µm et contiennent chacun quatre sporozoïtes haploïdes (Cacciò et Widmer, 2014).

La paroi de l'oocyste est composée de quatre couches (Figure 15) (Jenkins *et al.*, 2010) :

- Une couche externe formée par un glycocalyx, présentant une épaisseur d'environ 8 nm. Cette couche est principalement composée de glucides et de glycoprotéines.
- Une couche composée de lipides complexes, d'environ 4 nm d'épaisseur.
- Une couche protéique, conférant les caractéristiques structurales de l'oocyste. Cette couche mesure environ 13 nm.
- Une couche interne composée de glucides complexes et de polysaccharides, mesurant entre 25 et 40 nm.

Figure 15 - Modèle de la paroi de l'oocyste de *C. parvum* (Jenkins *et al.*, 2010)



- *Résistance dans l'environnement*

L'oocyste de *C. parvum* a la capacité de conserver ses propriétés infectieuses pendant plusieurs mois dans l'environnement, particulièrement dans un climat froid et humide (Fayer, 2004). Cette résistance est également observée dans l'eau douce jusqu'à 30°C. En revanche, les oocystes semblent plus rapidement inactivés à des températures supérieures à 35°C (Fayer, 1997).

- *Résistance aux procédés de désinfection*

Les oocystes de *C. parvum* présentent une résistance notable à la majorité des procédés de désinfection utilisés dans l'industrie ou à la ferme. Le tableau suivant présente les différents seuils de concentration et durées de contact nécessaires avec différents agents chimiques ou physiques pour l'inactivation des oocystes de *C. parvum in vitro*.

Tableau 4 – Procédures de désinfection réputées efficaces contre *C. parvum* (d'après O'Donoghue, 1995)

Agent	Temps de contact ou durée d'application	Références
Ammoniaque	5 % pendant 120 minutes	Campbell <i>et al.</i> , 1982
	50 % pendant 30 minutes	Sundermann <i>et al.</i> , 1987
Dioxyde de chlore	0,4 ppm pendant 15 minutes	Peeters <i>et al.</i> , 1989
	1,3 ppm pendant 60 minutes	Korich <i>et al.</i> , 1990
Dessication	Séchage à l'aire pendant 4 heures	Robertson <i>et al.</i> , 1992
Exspor ND¹	30 minutes	Angus <i>et al.</i> , 1989
Solution saline de formaldéhyde	10 % pendant 120 minutes	Campbell <i>et al.</i> , 1982
Congélation	-70°C, durée non spécifiée	Campbell <i>et al.</i> , 1982
Chaleur sèche	65°C pendant 30 minutes	Tzipori, 1983
Peroxyde d'hydrogène	3 % pendant 30 minutes	Angus <i>et al.</i> , 1989
Chaleur humide	45-55 °C pendant 15-20 minutes	Anderson, 1985
Oo-cide ND²	5 % pendant 5 minutes	Angus <i>et al.</i> , 1989
Ozone	1,11 ppm pendant 6 minutes	Peeters <i>et al.</i> , 1989
	1 ppm pendant 5 minutes	Korich <i>et al.</i> , 1990

¹ Agent commercial de stérilisation à froid à base de dioxyde de chlore.

² Préparation commerciale biphasique produisant de l'ammoniaque.

C. Pathologie et pathogénie

De manière générale, les maladies causées par les espèces du genre *Cryptosporidium* sont nommées cryptosporidioses. Les cryptosporidioses sont décrites chez de très nombreux hôtes – mammifères, poissons, amphibiens, reptiles et oiseaux. Certaines espèces – dont *C. parvum* – présentent un potentiel anthroponotique (Fayer, 1997).

En médecine vétérinaire, l'étude des cryptosporidioses est d'un intérêt majeur dans les élevages bovins, ovins et caprins.

a. La cryptosporidiose des ruminants

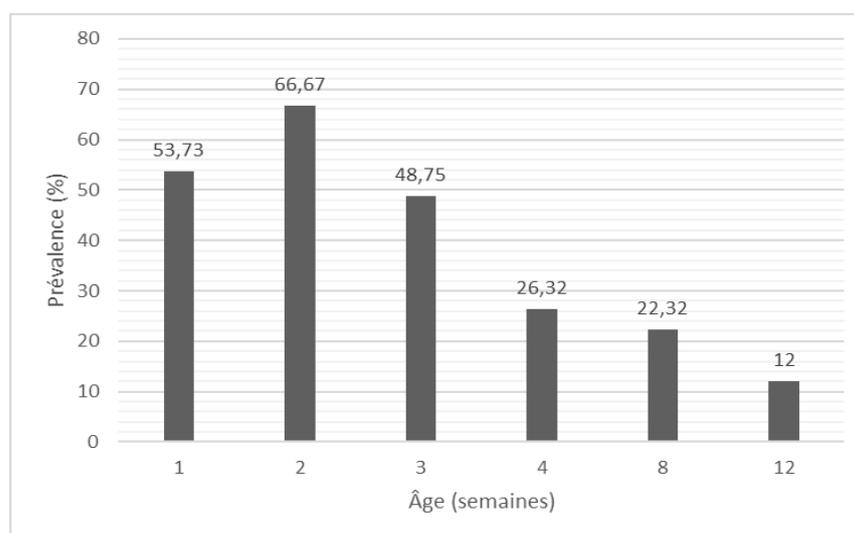
La première description de *C. parvum* chez un ruminant a été faite en 1971 sur une génisse de huit mois présentant une diarrhée chronique sans pour autant conclure sur l'origine étiologique de la diarrhée observée (Panciera *et al.*, 1971). Par la suite, le lien de causalité entre l'infection par *C. parvum* et les entérites néonatales est établi par épreuve infectieuse expérimentale de veaux sains (Heine *et al.*, 1984).

- *Prévalence et répartition géographique*

La cryptosporidiose des ruminants est une maladie cosmopolite, à répartition mondiale ; l'infection naturelle est documentée chez des animaux à partir de quatre jours d'âge mais est beaucoup plus commune entre une et quatre semaines d'âge, avec une médiane de deux semaines d'âge chez les animaux contaminés. L'expression de signes clinique semble concerner presque exclusivement des animaux nouveau-nés et des infections asymptomatiques sont décrites chez les adultes. Le système d'élevage laitier semble être plus propice à l'infection que les systèmes allaitants (Fayer, 1997; O'Donoghue, 1995).

La prévalence de *C. parvum* a fait l'objet d'un très grand nombre d'étude dont la plupart se concentre sur l'excrétion d'oocystes plutôt que sur l'expression des signes cliniques de diarrhée. Il apparaît ainsi dans une étude que près de 67 % des veaux de deux semaines d'âge sont excréteurs d'oocystes de cryptosporidies (figure 16). Cette même étude précise qu'avant trois mois, *C. parvum* est la cryptosporidie largement majoritaire (Santín *et al.*, 2008).

Figure 16 - Prévalence de l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* spp. chez le veau en fonction de l'âge (adapté de Santín *et al.*, 2008)



Chez les ovins et les caprins, la cryptosporidiose n'est pas aussi bien documentée que chez les bovins, il semble que la prévalence soit également importante chez les chevreaux et les agneaux (de l'ordre de 10 à 20 %). Ces taux d'excrétion sont très variables selon les études. Il apparaît que *C. parvum* est la première cause de diarrhées néonatale chez les chevreaux et les agneaux en Espagne (Chartier et Paraud, 2010).

- *Sources d'infection*

Les veaux nouveau-nés infectés sont une des principales sources du parasite, en effet, Santín *et al.* (2008) rapportent que près de 45 % des veaux âgés d'une à huit semaines sont excréteurs de *C. parvum*, lui-même à l'origine de 97 % des cas de cryptosporidiose chez les animaux non-sevrés. Les nouveau-nés infectés excrètent 10^6 à 10^7 oocystes par gramme de matière fécale (de Graaf *et al.*, 1999). Fayer (1997) suggère une ID_{50} (c'est-à-dire la dose nécessaire pour infecter expérimentalement 50 % des individus) *maximale* comprise entre 100 et 500 oocystes. Un gramme de matières fécales de nouveau-né infecté par *C. parvum* a donc *théoriquement* la capacité d'infecter plus d'un million d'individus, ce qui explique le caractère explosif de sa propagation dans un groupe.

La plupart des bovins adulte sont excréteurs d'oocystes de cryptosporidies, néanmoins, l'infection de ces derniers par *C. parvum* semble rare. On retrouve plutôt *C. andersoni* dans cette catégorie d'âge (de Graaf *et al.*, 1999; Santín *et al.*, 2008). Le rôle des adultes dans la transmission de *C. parvum* semble donc mineur. De manière anecdotique, une étude décrit des cas suggérant la possibilité d'une transmission *in utero* (Fayer, 2004).

Les rongeurs et les cervidés sauvages sont sensibles à la contamination par *C. parvum* (Fayer, 2010; Šlapeta, 2013). Ces animaux constituent donc un réservoir du parasite dans l'environnement. Il semble qu'une population élevée de rongeurs soit corrélée avec un niveau de contamination élevé. Certaines études suggèrent une transmission facile du parasite entre les ruminants et les rongeurs.

- *Signes cliniques*

Chez les jeunes ruminants, le tableau clinique est dominé par une diarrhée d'aspect varié (aqueuse à muqueuse, jaunâtre à brune et d'odeur souvent nauséabonde), associée à un abattement, une anorexie et des douleurs abdominales (Figure 17, Figure 18). D'autres signes cliniques comme de l'hyperthermie, une perte de poids, un pelage piqué et du météorisme (O'Donoghue, 1995).

Après quelques jours d'évolution, l'issue est la guérison spontanée avec retard de croissance marqué ou la mort. La mortalité est généralement faible chez les bovins. Les chevreaux sont plus sévèrement atteints avec un taux de mortalité pouvant atteindre 80 % (Chartier et Paraud, 2010).

Figure 17 – Aspect de la diarrhée chez un chevreau atteint de cryptosporidiose (Ghecham, 2012 in *Vétofocus*)

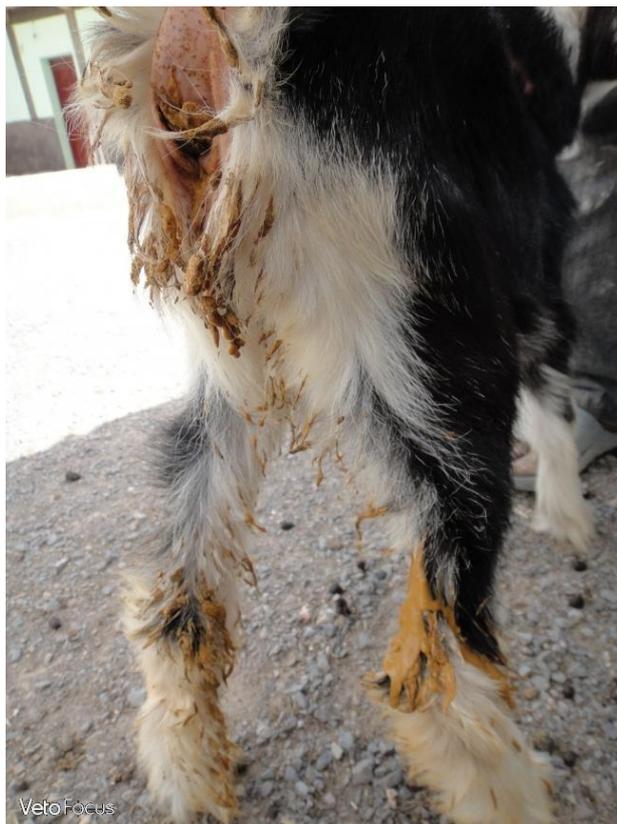


Figure 18 - Aspect de la diarrhée chez un veau mort de cryptosporidiose (Chartier et Paraud, 2010)



b. La cryptosporidiose chez l'être humain

Les premiers cas de cryptosporidiose décrits chez l'être humain remontent à 1976. *Cryptosporidium* est dans un premier temps reconnu comme un parasite opportuniste, majoritairement retrouvé chez des individus immunodéprimés (O'Donoghue, 1995).

Les nombreuses épidémies recensées depuis 1976 ont conduit à réévaluer son importance en santé publique. Il est désormais admis que *Cryptosporidium* est une des causes les plus courantes de gastro-entérite chez l'être humain, notamment dans les pays les moins avancés et les pays en voie de développement en raison du manque d'hygiène et de la malnutrition (Fayer et Xiao, 2008).

- *Prévalence et répartition géographique*

La cryptosporidiose est présente dans au moins 70 pays, à des prévalences variables. Le plus haut taux de prévalence estimé est au Mexique avec près de 70 % dans la population générale. La prévalence mondiale est estimée à 7,6 %. Le tableau suivant présente les prévalences estimées en fonction des revenus et de la catégorie de population.

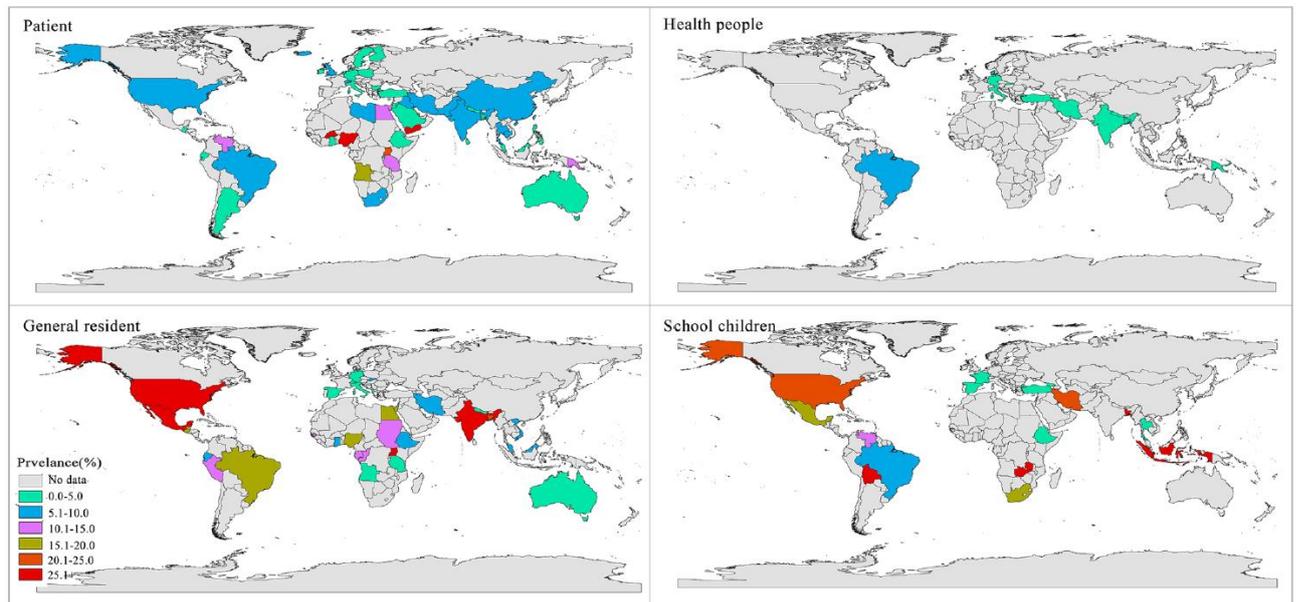
Tableau 5 - Prévalence des infections à *Cryptosporidium* dans différentes populations en fonction du revenu médian dans le pays (Dong *et al.*, 2020)

	High income		Upper middle income		Lower middle income		Low income		Total	
	No (<i>I</i> ²)	Prevalence (95% CI)	No (<i>I</i> ²)	Prevalence (95% CI)						
General residents	30,236 (98.0%)	16.1 (7.4–27.3)	6744 (99.1%)	15.7 (7.8–25.7)	5644 (97.6%)	14.3 (8.7–21.0)	18,761 (97.9%)	9.3 (6.4–12.7)	34,259 (98.5%)	13.4 (10.6–16.6)
Patients	3060 (92.0%)	3.6 (2.9–4.5)	30,149 (92.8%)	4.7 (3.8–5.7)	35,318 (95.1%)	6.8 (5.6–8.2)	8870 (99.2%)	12.2 (8.0–17.3)	104,573 (95.6%)	6.0 (5.3–6.7)
School children	1651 (77.8%)	3.5 (1.2–7.0)	3263 (96.6%)	9.9 (5.0–16.2)	1679 (93.5%)	34.6 (25.6–44.2)	393 (-)	4.7 (2.8–7.0)	6146 (97.7%)	16.4 (10.7–23.0)
Healthy people	3110 (90.5%)	1.1 (1.8–5.4)	1585 (75.6%)	2.8 (1.6–4.4)	1179 (61.3%)	3.4 (1.8–5.4)	250 (92.9%)	2.9 (0.4–15.9)	4665 (83.7%)	2.6 (1.5–3.9)
Total	39,850 (94.2%)	4.3 (3.5–5.2)	41,741 (97.1%)	6.8 (5.4–8.3)	43,820 (96.9%)	9.4 (7.9–11.1)	28,602 (98.1%)	10.4 (7.9–13.2)	154,013 (97.1%)	7.6 (6.9–8.5)

Les catégories de populations les plus affectées par la cryptosporidiose sont situées dans les pays les plus pauvres, en raison des conditions d'hygiène et de malnutrition. Il est intéressant de constater que, dans la population générale, les pays les plus riches présentent la plus forte prévalence. Cette incohérence s'explique par l'importance majeure de l'élevage bovin laitier qui provoque une forte séroprévalence parmi les habitants des zones rurales (Dong *et al.*, 2020).

La carte suivante indique la prévalence dans plusieurs pays en fonction de la catégorie de population considérée.

Figure 19 - Prévalence nationale de la cryptosporidiose en fonction des catégories de population (Dong et al., 2020)



Les personnes immunodéprimées sont particulièrement sensibles à l'infection, notamment les malades du SIDA, les individus transplantés recevant un traitement immunosuppresseur antirejet et les malades hospitalisés. Chez ces individus, le risque de passage de la maladie à la chronicité est majoré. La cryptosporidiose chronique est d'ailleurs l'une des maladies infectieuses à caractère opportuniste (avec la pneumocystose et la toxoplasmose cérébrale) qui indique le passage d'un porteur du VIH au stade SIDA. (Fayer, 2004; Fayer et Xiao, 2008; Tzipori et Widmer, 2008)

- *Sources d'infection*

Toutes les espèces citées au

Tableau 3 – y compris l'être humain – sont des sources potentielles de contamination. Les ruminants sont particulièrement importants dans le cycle de contamination en raison de la très forte charge de leurs matières fécales en oocystes infectants (jusqu'à 10^{10} oocystes par individu) et de la durée d'excrétion (sept à dix jours). (Fayer et Xiao, 2008)

Comme chez les ruminants, la contamination humaine se fait par voie oro-fécale par ingestion d'oocystes. Celle-ci peut être directe par contact rapproché – particulièrement au sein du foyer ou par manipulation de jeunes ruminants – ou indirecte *via* des eaux ou des aliments souillés.

Il convient de noter que le mode de transmission interhumaine est majoritaire dans les pays les moins avancés et en développement alors que le mode de transmission zoonotique semble privilégié dans les pays développés. (Fayer et Xiao, 2008; Xiao *et al.*, 2004)

- *Signes cliniques*

Les signes cliniques de l'infection transitoire chez l'humain sont très proches de ceux observés chez les ruminants. On observe une gastroentérite avec diarrhée aqueuse à muqueuse très abondante associée à une perte de poids et une déshydratation. Des symptômes secondaires peuvent être associés comme du météorisme abdominal, des nausées, des vomissements et un syndrome fébrile. La période pré-patente est d'environ deux semaines et les signes cliniques peuvent s'exprimer pendant trois semaines (Chalmers et Davies, 2010; Fayer et Xiao, 2008).

Ces signes sont en général bien tolérés chez l'adulte mais la déshydratation, si elle est mal contrôlée, peut être à l'origine de la mort chez l'enfant, notamment dans les pays les moins avancés (Chalmers et Davies, 2010).

Chez les patients immunodéprimés, l'infection peut devenir chronique et finir par s'étendre à l'ensemble du tube digestif, aux voies biliaires et pancréatiques ainsi qu'à l'arbre bronchique, ce qui est à l'origine de complications graves comme des pancréatites, des cholécystites et cholangites, des hépatites et cirrhoses biliaires ainsi que des bronchites et sinusites (Chalmers et Davies, 2010; Fayer, 2004; O'Donoghue, 1995).

c. Tableau lésionnel

L'examen nécropsique est souvent peu spécifique et les lésions relevées sont peu caractéristiques. Le tableau lésionnel macroscopique comprend une distension gazeuse des intestins avec un contenu aqueux, une congestion de la muqueuse intestinale et des signes d'entérocolite.

L'examen anatomopathologique de la paroi intestinale est plus informatif ; il révèle en général une atrophie discrète à modérée des villosités – qui présentent un aspect raccourci, fusionné ou émoussé – une hyperplasie des cryptes intestinales, des foyers de nécrose ou de perte de substance épithéliale et une infiltration du chorion par des cellules mononuclées. Dans la plupart des cas, des trophozoïtes, des mérontes ou des gamontes sont directement observés (O'Donoghue, 1995). Il est important de préciser que l'examen histologique est très mal corrélé à la charge parasitaire et à l'expression clinique (Guerrant et Warren, 2007).

d. Pathogénie et physiopathologie

Si l'envahissement de la muqueuse intestinale de l'hôte par *C. parvum* est largement considéré comme étant à l'origine de la diarrhée observée, le mécanisme précis de celle-ci est encore obscur. Trois explications sont à ce jour retenues : diarrhée osmotique par malabsorption, diarrhée sécrétoire liée à la réponse inflammatoire de l'hôte, diarrhée sécrétoire liée à une entérotoxine parasitaire (Leitch et He, 2011). Ces trois composantes ne sont pas mutuellement exclusives et leur contribution variable pourrait expliquer la variété de présentations cliniques observées.

Les modifications histologiques provoquant une diminution de la surface d'absorption intestinale expliquent la diarrhée par malabsorption. Il semblerait également que le parasite inhibe l'apoptose des entérocytes qui présentent alors des caractéristiques nécrotiques, ainsi qu'une destruction des jonctions serrées à l'origine d'une fuite d'ions chlorure (Guerrant et Warren, 2007; Mele *et al.*, 2004). Tous ces paramètres altèrent fortement la capacité d'absorption des entérocytes, ce qui, *in fine*, conduit à une diarrhée osmotique.

La composante inflammatoire est moins bien documentée, il semblerait que la substance P et les prostaglandines produites par les cellules inflammatoires stimulent la sécrétion de chlorure et la malabsorption du glucose (Argenzio *et al.*, 1993; Hernandez *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 1998).

La composante entérotoxinique parasitaire est encore très peu documentée, aussi, il convient de la considérer avec précaution (Guerrant et Warren, 2007).

e. Diagnostic

Le diagnostic de la cryptosporidiose ne saurait être entièrement clinique, en effet, le tableau clinique est peu spécifique et toute entérite subaigüe peut se présenter de la même manière. La méthode de référence est la mise en évidence directe d’ocystes ou d’antigènes dans les matières fécales. Il existe des tests antigéniques développés en médecine vétérinaire qui permettent le dépistage en ferme (figure 20).

Figure 20 - Exemple de test rapide permettant le dépistage sur le terrain de l'excrétion d'ocystes de *Cryptosporidium*, associé avec d'autres pathogènes à l'origine de diarrhées chez le jeune ruminant : Virbac© Speed V-Diar (source Virbac© Europe)



En cas de besoin, les fèces peuvent être conservées dans du bichromate de potassium³, bien qu’aucune mesure de préservation des ocystes ne soit en général nécessaire.

En laboratoire, la mise en évidence des ocystes peut se faire par la méthode de Ziehl-Neelsen modifiée ou bien par immunofluorescence directe. Il est également possible d’utiliser des méthodes immunoenzymatiques ou immunochromatographiques (Leitch et He, 2011).

³ La conservation des fèces au bichromate de potassium sera bientôt impossible, cette substance ayant été ajouté le 11 octobre 2023 à l’annexe XIV du règlement REACH par la Commission Européenne.

Le tableau suivant présente quelques exemples de kits commerciaux disponibles pour le diagnostic de *C. parvum* en laboratoire.

Tableau 6 - Exemples de kit commerciaux permettant le dépistage de *C. parvum* en laboratoire (Leitch et He, 2011)

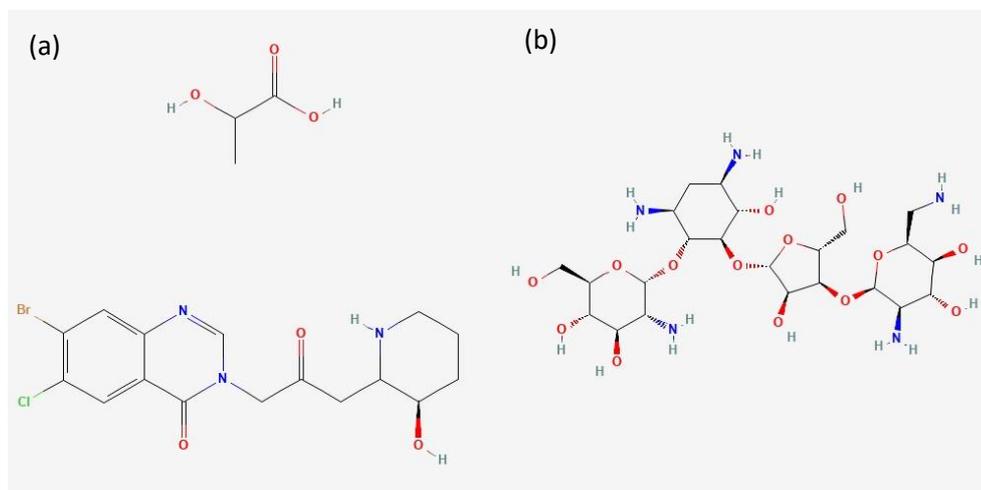
Technique	Kit/Fabricant
Coloration	Auramine/phenol stain 2 (hpa-standardmethods.org.uk)
	BBL*TB Kinyoun Stain reagent kit (BD)
	483K (Kinyoun) and 484K Ziehl-Neelson (Medical Chemical Corp.)
Immunofluorescence	PL-8060 (Pro-Lab Diagnostics)
	MeriFluor Crypto/Giardia (Meridian Diagnostics, Inc.)
	Aqua-GloG/C kit (Waterborne Inc.)
	DetectIF Cryptosporidium (Shield Diagnostics Ltd.)
Techniques immunoenzymatiques (EIA ou ELISA)	Hydrofluor Combo Giardia/Cryptosporidium (Strategic Diagnostics Inc.)
	ProSpec T microplate assay (Alexon-Trend Inc.)
	IDEIA Cryptosporidium (Dako Corp.)
Techniques immunochromatographiques	Color Vue Cryptosporidium (Seradyn Inc)
	ImmunoCard STAT! Cryptosporidium/Giardia (Meridian Bioscience Inc.)
	Color PAC Giardia/Cryptosporidium (Becton Dickinson)

f. Traitement

Chez l'animal comme chez l'humain immunocompétent, la cryptosporidiose ne nécessite le plus souvent pas de traitement spécifique, uniquement des mesures de réhydratation et de contrôle de la diarrhée. Les troubles métaboliques, hydroélectrolytiques et de l'équilibre acido-basique doivent systématiquement être recherchés et traités.

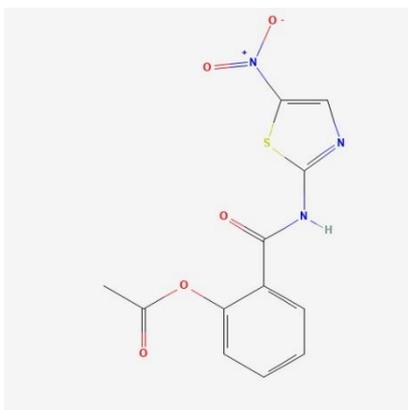
Dans les cas les plus sévères, les possibilités thérapeutiques à visée curative sont réduites. Il n'existe en effet – en médecine vétérinaire – que deux médicaments dont le RCP mentionne la cryptosporidiose (le lactate d'halofuginone et le sulfate de paromomycine [figure 21]). Seule la paromomycine dispose d'une AMM dans l'indication « Traitement des infections causées par *C. parvum* diagnostiqué, par réduction de la diarrhée et réduction de l'excrétion fécale d'oocystes » chez le bovin nouveau-né. (Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments, de l'environnement et du travail, 2022; European Medicines Agency, 2018)

Figure 21 - Formules chimiques du lactate d'halofuginone (a) et de la paromomycine (b) (National Institute for Health, 2023a, 2023b)



Pour la cryptosporidiose humaine, aucune molécule n'est autorisée en Europe dans un cadre curatif. La FDA américaine a approuvé l'usage du nitazoxanide (figure 22) en 2005 dans le traitement étiologique des infections gastro-intestinales à *Cryptosporidium*. Il s'agit d'un antiparasitaire à large spectre de la famille des thiazolides dont l'usage est interdit en Europe en médecine vétérinaire. (Hemphill *et al.*, 2006)

Figure 22 - Formule chimique du nitazoxanide (National Institute for Health, 2023c)



La difficulté de la mise en place de ces traitements et les considérations sur l'antibiorésistance qui peuvent en émerger sont la dernière facette que nous évoquerons au sujet de *Cryptosporidium*. Depuis peu, la communauté scientifique s'intéresse de plus en plus à un virus découvert chez *C. parvum* : le *Cryspovirus*.

2. Généralités sur *Cryspovirus*

A. Historique et classification

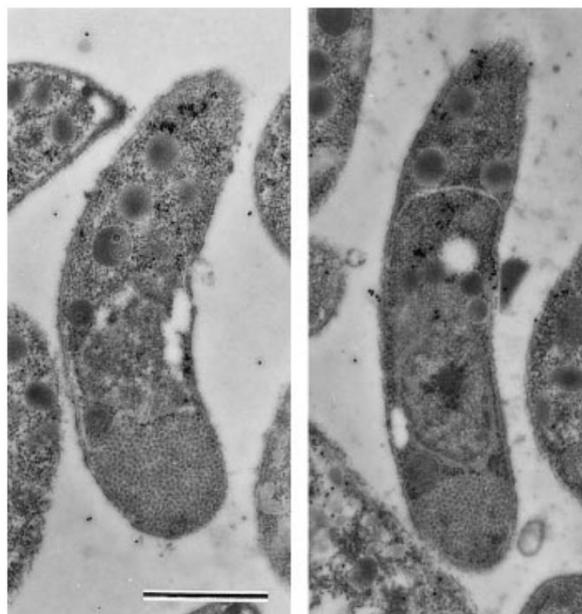
a. Découverte

Les premières observations expérimentales tendant à mettre en évidence *Cryspovirus* remontent à 1995. Une équipe britannique détecte un profil génomique correspondant à un picobirnavirus dans une suspension de matières fécales humaines infectées par *C. parvum*. (Gallimore *et al.*, 1995)

En 1997, une équipe de l'Université du Kansas à Manhattan découvre grâce à des techniques de biologie moléculaire deux fragments d'ARN bicaténaire résidant dans le cytoplasme des sporozoïtes (figure 23). Ces résultats sont rapprochés de l'étude de 1995. Le séquençage d'un de ces fragments est compatible avec une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) virale (Khramtsov *et al.*, 1997). De nouvelles études menées par la même équipe infirment l'hypothèse du picobirnavirus émise par Gallimore *et al.* et classifient cette découverte au sein de la famille des *Partitiviridae* (Nibert *et al.*, 2009). Il s'agirait du premier virus de cette famille infectant des protozoaires, en effet, les *Partitiviridae* sont habituellement retrouvée chez des plantes et des champignons.

En 2009, l'espèce est officiellement reconnue par l'ICTV sous le nom *Cryptosporidium parvum virus 1*, abrégé CSpV-1.

Figure 23 - Électronographie de sporozoïtes de *C. parvum* après hybridation *in situ* avec de l'ADNc marqué élaboré à partir des séquences d'ARN viral (Khramtsov *et al.*, 1997)



b. Classification

CSpV-1 constitue l'unique représentant du genre *Cryspovirus* à l'heure actuelle et son espèce-prototype⁴. Il appartient à la famille des *Partitiviridae*. Le tableau 7 présente la classification systématique ICTV de CSpV-1. Dans le système de Baltimore, CSpV-1 est classé dans le groupe III des virus à ARN double brin.

Les classifications ICTV et Baltimore sont complémentaires et reprennent chacune des éléments respectifs de l'autre. Aucune n'est purement phylogénétique, en effet, l'origine commune des virus n'est pas établie. (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2022)

Tableau 7 - Classification ICTV de CSpV-1

Classification	
Domaine	<i>Riboviria</i>
Règne	<i>Orthornavirae</i>
Embranchement	<i>Pisuviricota</i>
Classe	<i>Duplopiviricetes</i>
Ordre	<i>Durnavirales</i>
Famille	<i>Partitiviridae</i>
Genre	<i>Cryspovirus</i>
Espèce	<i>Cryptosporidium parvum virus 1</i>

CSpV-1 est étroitement apparenté à des virus infectant des plantes et des champignons et il semble être le seul *Partitiviridae* infectant un protozoaire. La figure 24 présente l'arbre phylogénétique des *Partitiviridae*.

⁴ Les termes « CSpV-1 » et « *Cryspovirus* » seront mutuellement interchangeables et synonymes dans la suite de ce travail.

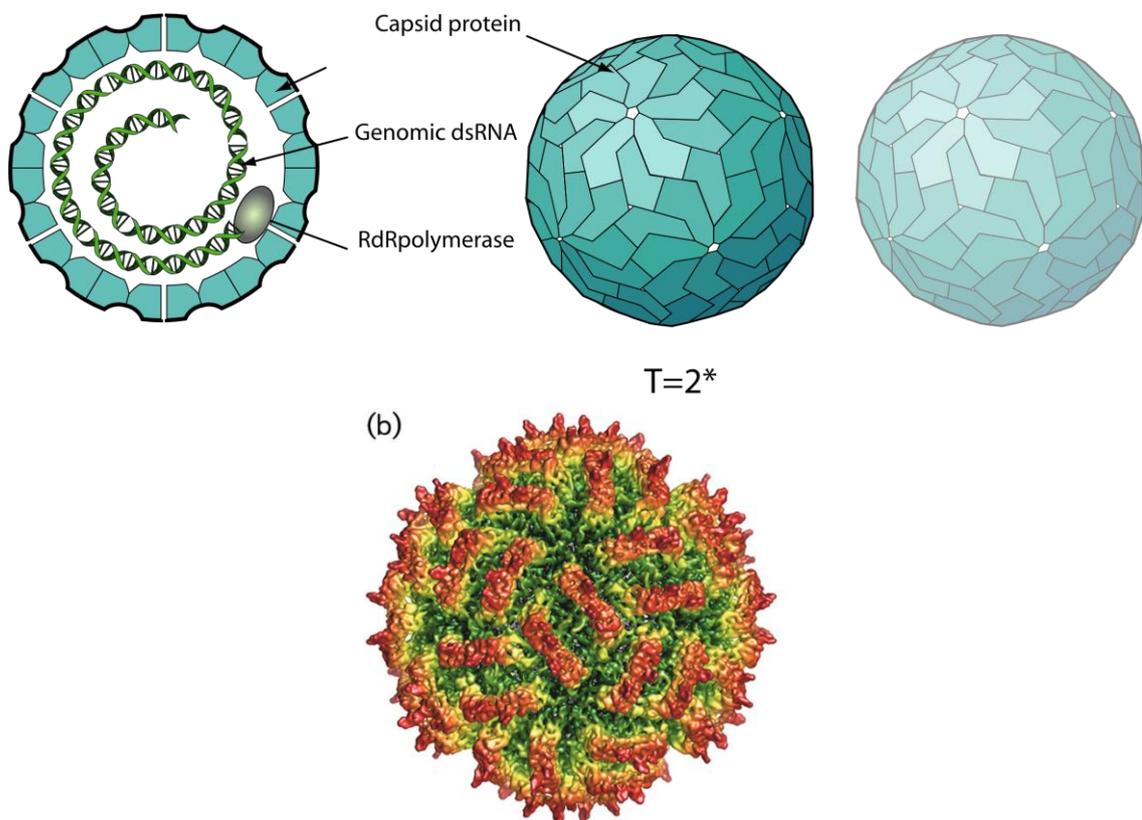
B. Biologie de CSpV-1

a. Caractéristiques du virion

- Aspects généraux

CSpV-1, comme tous les virus de la famille des *Partitiviridae*, se présente sous la forme de particules virales isométriques, de forme icosaédrique, nues, mesurant en moyenne 31 nm de diamètre (Figure 24). Son génome est composé de deux brins d'ARN bicaténaire, chacun encapsidé séparément. Les deux brins codent respectivement pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et une protéine de capsid (CP). La capsid est composée de 60 dimères de la protéine CP et contient un exemplaire de RdRp. Il convient de noter que le virion ne semble pas présenter de système permettant l'invasion d'une cellule-hôte (Nibert *et al.*, 2009; Vainio *et al.*, 2018).

Figure 24 - Aspect typique d'un virion de *Partitiviridae* (Hulo *et al.*, 2011; Vainio *et al.*, 2018)



- *Aspects génomiques et protéomiques*

Le matériel génétique de CSpV-1 se compose de deux segments d'ARN, un grand segment de 1 786 pb – noté dsRNA1 – et un petit fragment de 1 374 pb – noté dsRNA2 (Figure 25). Parmi les *Partitiviridae*, CSpV-1 présente un dsRNA2 significativement plus petit que les autres espèces de la famille. Ces deux fragments sont encapsidés séparément dans des virions différents qui contiennent donc chacun un exemplaire de dsRNA1 ou de dsRNA2, cette particularité est caractéristique des *Partitiviridae* (Vainio *et al.*, 2018).

Chaque fragment d'ARN comprend dans son brin plus un long cadre de lecture ouvert (ORF) codant respectivement pour RdRp dans dsRNA1 et pour CP dans dsRNA2. Les brins moins semble être non-codants.

Les particules virales se comportent comme des « nanomachines » : la RdRp qu'elles contiennent assure la transcription des deux segments d'ARN. Cette transcription a pour originalité d'être asymétrique – seul le brin plus est transcrit – et semi-conservative – le brin matrice est relâché dans le cytoplasme alors que le brin fils est conservé par la RdRp pour devenir le nouveau brin matrice. Les copies monocaténares des segments matrices sont ensuite adressée aux ribosomes de l'hôte à l'image d'ARN messagers et traduites en protéines.

La RdRp semble jouer un rôle pour l'instant mal défini dans la réplication du brin moins, nécessaire à la production de nouveaux virions (Nibert *et al.*, 2009).

Figure 25 - Organisation génomique de CSpV-1 (Nibert *et al.*, 2009)

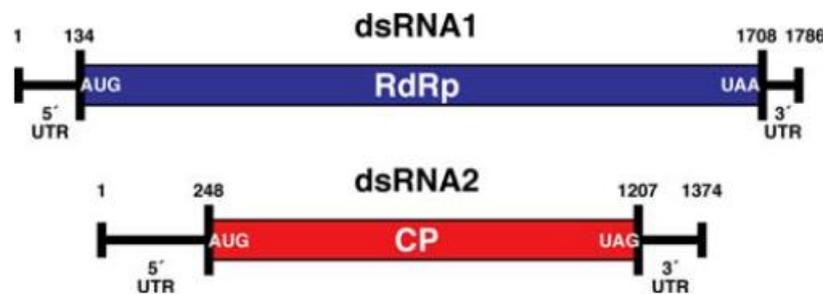
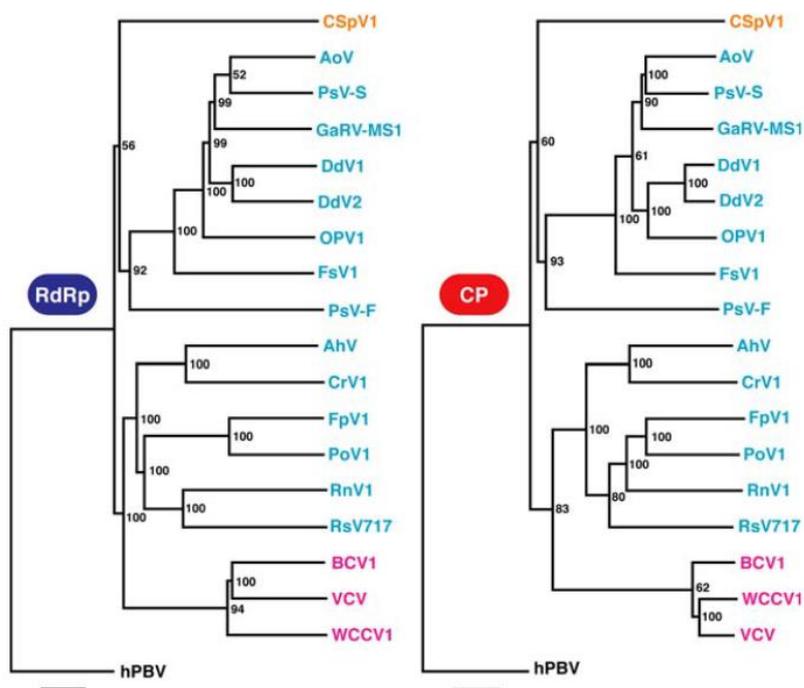


Tableau 8 - Comparaison des caractéristiques principales des *Partitiviridae* et de CSpV-1 (d'après Khramtsov *et al.*, 1997 ; Khramtsov et Upton, 2000 ; Khramtsov *et al.*, 2000 ; Nibert *et al.*, 2009 ; Vainio *et al.*, 2018)

<i>Propriété</i>	<i>Partitiviridae</i>	<i>CSpV-1</i>
<i>Localisation dans la cellule-hôte</i>	Cytoplasmique	Cytoplasmique
<i>Diamètre de la particule virale (nm)</i>	30-40	31
<i>Forme du virion</i>	Isométrique, nu, icosaédrique	Isométrique, nu, icosaédrique
<i>Protéine de capsid</i>	Protéine unique de 43-73 kDa, 60 dimères	Protéine unique de 37 kDa, 60 dimères
<i>Acide nucléique</i>	Deux segments d'ARN bicaténaire de 1,4-3,0 kpb, monocistroniques, encapsidés séparément	Deux segments d'ARN bicaténaire de 1,4 et 1,7 kpb, monocistroniques, encapsidés séparément
<i>dsRNA1</i>	Code pour RdRp	Code pour RdRp
<i>dsRNA2</i>	Code pour CP	Code pour CP
<i>Transcription</i>	Semi-conservative	Semi-conservative
<i>Activité RdRp</i>	Associée au virion	Associée au virion
<i>Transmission</i>	Verticale, sans phase extracellulaire	Verticale et horizontale lors de la reproduction sexuée, sans phase extracellulaire ⁵
<i>Effets sur l'hôte</i>	Généralement sans effet, infection latente et persistante	Non connus avec précision, effet probable sur la fécondité, infection latente et persistante

⁵ Suspectée (Nibert *et al.*, 2009)

Figure 26 - Arbres phylogénétiques des deux fragments d'ARN des *Partitiviridae* (groupe externe : picobirnavirus humain) (Nibert *et al.*, 2009) : les couleurs correspondent aux genres au sein de la famille (orange pour *Cryspovirus*, cyan pour *Partitivirus* et magenta pour *Alphacyptovirus*)



b. Transmission de CSpV-1

Comme précisé ci-dessus, CSpV1 ne présente pas de mécanisme permettant l'invasion d'une cellule-hôte sur sa capsid, sa transmission repose donc exclusivement sur des moyens intracellulaires. Le virus peut être transmis verticalement par mitose au cours de la reproduction asexuée de *C. parvum* ou bien horizontalement lors de la fusion des microgamontes et des macrogamontes (Nibert *et al.*, 2009).

c. Effet sur l'hôte

L'infection de *C. parvum* par CSpV-1 semble être persistante et avirulente, à l'image de la majorité des *Partitiviridae* (Nibert *et al.*, 2009; Vainio *et al.*, 2018). Certaines publications décrivent CSpV-1 comme un *symbiote viral* (Berber *et al.*, 2021; Jenkins *et al.*, 2015, 2008; Kniel *et al.*, 2004; Kniel et Jenkins, 2005)

Chez le veau, la charge virale en CSpV-1 de *C. parvum* est positivement corrélée avec le succès reproducteur du parasite. En effet, des animaux infectés par des lignées plus riches en CSpV-1 ont présenté une charge parasitaire jusqu'à cinq fois plus importante que des animaux infectés par des lignées pauvres en CSpV-1 (Jenkins *et al.*, 2008).

L'effet le plus marqué de CSpV-1 semble plutôt être sur la pathogénie de *C. parvum*, en effet, le virus interagit avec l'hôte du parasite et est transféré dans les cellules épithéliales lors de l'invasion. Deux modes d'interaction sont pour l'instant étudiés. Le premier concerne la voie de signalisation de l'interféron I et le second repose sur l'ARN non-codant U90926 (Deng *et al.*, 2023; Graham *et al.*, 2023).

- *Effet sur la voie de l'interféron I*

Chez l'hôte mammifère, les interférons sont cruciaux dans la mise en œuvre de la réponse antiparasitaire au niveau de l'intestin. Sur modèle murin, il semblerait que la présence de CSpV-1 inhibe en partie la voie de signalisation de l'interféron I, le mécanisme précis n'est pas connu (Deng *et al.*, 2023).

- *Effet sur l'ARN non-codant U90926*

L'ARN non-codant U90926 est présent dans les macrophages et semble jouer un rôle protecteur vis-à-vis des chocs endotoxiques, il présente également un effet inhibiteur sur la réponse inflammatoire à *C. parvum* en raison d'une activité régulatrice de la transcription des gènes nécessaires à cette dernière. Or, la présence de CSpV-1 est très probablement corrélée avec une augmentation de l'activité U90926, ce qui permettrait un échappement de *Cryptosporidium* à la réponse immunitaire innée (Graham *et al.*, 2023).

C. Épidémiologie de CSpV-1

a. Épidémiologie descriptive

Un nombre très restreint de publications s'intéressant à l'épidémiologie de CSpV-1 est disponible à ce jour. La prévalence observée de CSpV-1 est très variable, certaines équipes mesurent un taux d'infection proche de 100 % (Khramtsov *et al.*, 2000; Murakoshi *et al.*, 2016), une autre équipe rend compte d'un taux de inférieur à 10 % (Berber *et al.*, 2021). En 2023, une équipe française rend compte d'un taux de prévalence de l'ordre de 95 % (Adjou *et al.*, 2023). La recherche sur *Cryptosporidium* est pour l'instant trop parcellaire, que ce soit géographiquement ou quantitativement, pour conclure sur une prévalence du virus au sein des diverses populations de *C. parvum*.

b. Épidémiologie moléculaire

Les informations concernant l'épidémiologie moléculaire de CSpV-1 sont à ce jour très parcellaires. Il semble que le segment dsRNA2 portant le gène de CP soit mieux conservé que dsRNA1 portant le gène de la RdRp, on peut donc supposer que ce dernier est à même de constituer un bon indicateur phylogénétique. Il ressort de l'analyse des séquences dsRNA1 que les isolats forment des clades géographiques bien déterminés (figures 27 et 28) (Adjou *et al.*, 2023; Berber *et al.*, 2021; Murakoshi *et al.*, 2016).

Figure 27 - Arbre phylogénétique de CSpV-1 construit grâce à la séquence de dsRNA1 (Adjou *et al.*, 2023) : la carte en encart indique les différents départements d'origine des échantillons, la barre latérale indique les pays d'origine des échantillons, la barre d'échelle montre le nombre de

changements de nucléotide, les échantillons sont numérotés séquentiellement, la lettre indique l'espèce d'origine (B : bovin, O : ovin, C : caprin), suivi du numéro du département.

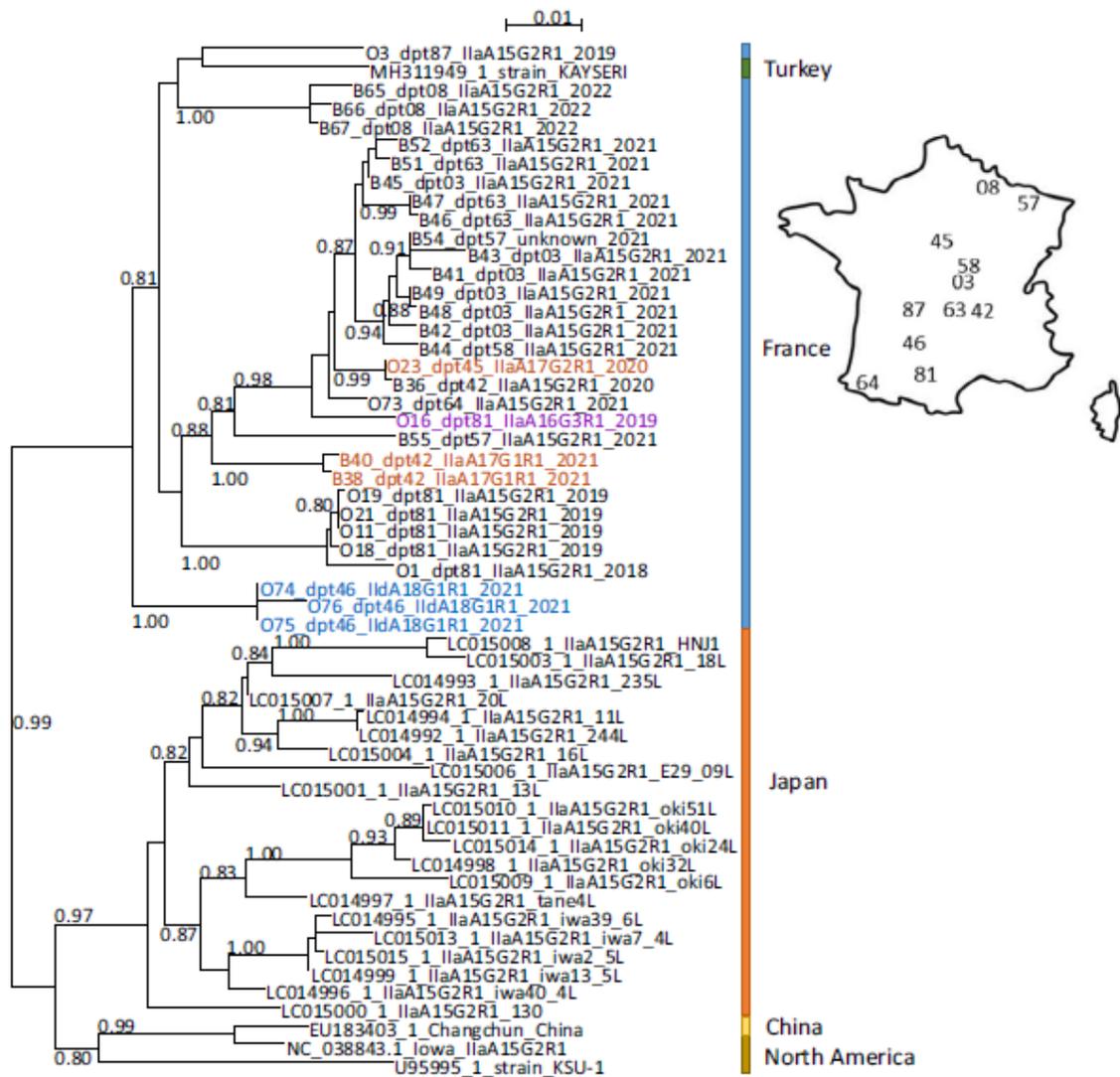
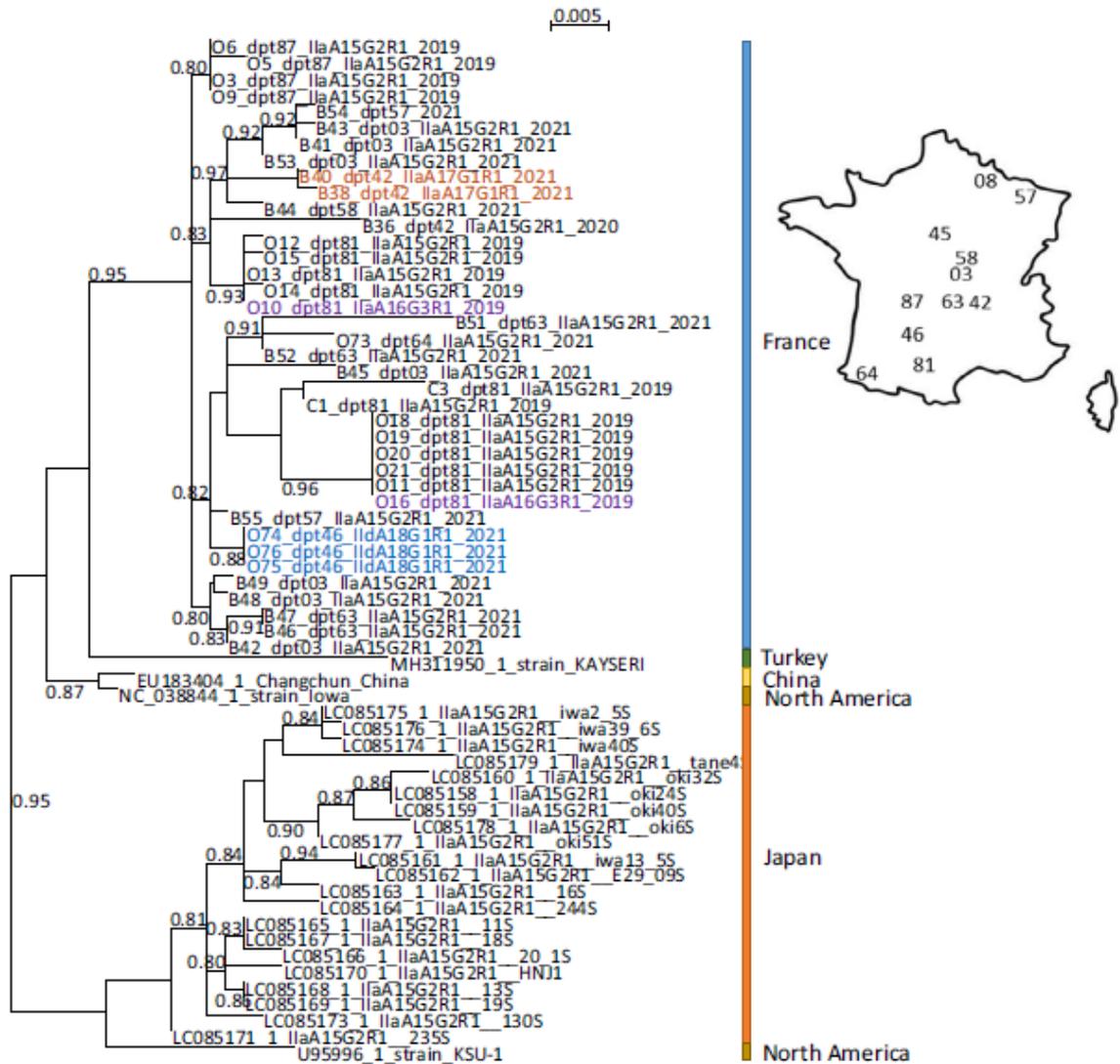


Figure 28 - Arbre phylogénétique de CSpV-1 construit à partir de la séquence de dsRNA2 (Adjou *et al.*, 2023): la carte en encart indique les différents départements d'origine des

échantillons, la barre latérale indique les pays d'origine des échantillons, la barre d'échelle montre le nombre de changements de nucléotide, les échantillons sont numérotés séquentiellement, la lettre indique l'espèce d'origine (B : bovin, O : ovin, C : caprin), suivi du numéro du département.



Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Comme expliqué précédemment, le rôle et l'effet précis de CSpV-1 sur la pathogénicité de *Cryptosporidium* sont pour l'instant mal déterminés. Ce travail visait principalement à déterminer la présence de CSpV-1 chez l'homme et les ruminants en France ainsi qu'à fournir une analyse épidémiologique moléculaire en vue d'évaluer l'impact du virus sur la pathogénicité du parasite.

L'intégralité des manipulations présentées dans la suite de ce travail a été réalisée par mes soins, sous la direction du groupe *Cryptosporidium-Giardia* de l'UMR BIPAR, à l'exception des séquençages.

2. Matériels et méthodes

L'analyse expérimentale s'est articulée autour de trois phases : recherche et typage de *Cryptosporidium*, recherche et séquençage du génome de CSpV-1 et analyse génomique des séquences récupérées.

Le travail a porté sur 58 échantillons issus de trois espèces (homme, ovins et bovins). Des échantillons de ruminants ont été fournis par des vétérinaires sur le terrain, des échantillons humains ont été fournis par le CNR (Centre national de référence) de Rouen. Les différents protocoles expérimentaux ont été réalisés au laboratoire de santé animale de l'Anses Maisons-Alfort, au sein de l'UMR BIPAR. Les tableaux récapitulatifs des échantillons et les protocoles précis sont annexés à ce manuscrit.

Dans la suite de ce travail, les échantillons seront numérotés selon le système utilisé par Adjou *et al.*, 2023. Une lettre indique l'espèce d'origine de l'échantillon : B pour bovin, O pour ovin, R pour Rouen, ce qui correspond aux échantillons humains. Un numéro séquentiel est ensuite attribué.

A. Recherche et typage de *Cryptosporidium*

Cette partie n'a été réalisée que sur les échantillons ovins et bovins, en effet, les échantillons humains ont été fournis préalablement sous-typés par le CNR de Rouen. Elle a consisté dans un premier à une mise en évidence directe du parasite par immunofluorescence directe grâce au kit commercial Merifluor© *Cryptosporidium/Giardia* après mise en suspension des matières fécales dans du PBS. Les lames ont ensuite été observées au microscope à fluorescence.

Les échantillons positifs ont ensuite subi une extraction d'ADN grâce au kit commercial Qiagen© Qlamp Mini Kit DNA.

a. PCR 18S

Une PCR nichée visant à amplifier le gène de l'ARNr 18S de *Cryptosporidium* spp. est ensuite réalisée. Cette PCR utilisait un Master Mix commercial Promega© M7502. La première amplification utilisait les amorces suivantes : F2 (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') et R2 (5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'). La seconde amplification utilisait les amorces suivantes : F3 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3') et R3 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3').

Toutes les amorces utilisées sont commercialisées par Eurofins© et étaient utilisées à la concentration de 10 µM.

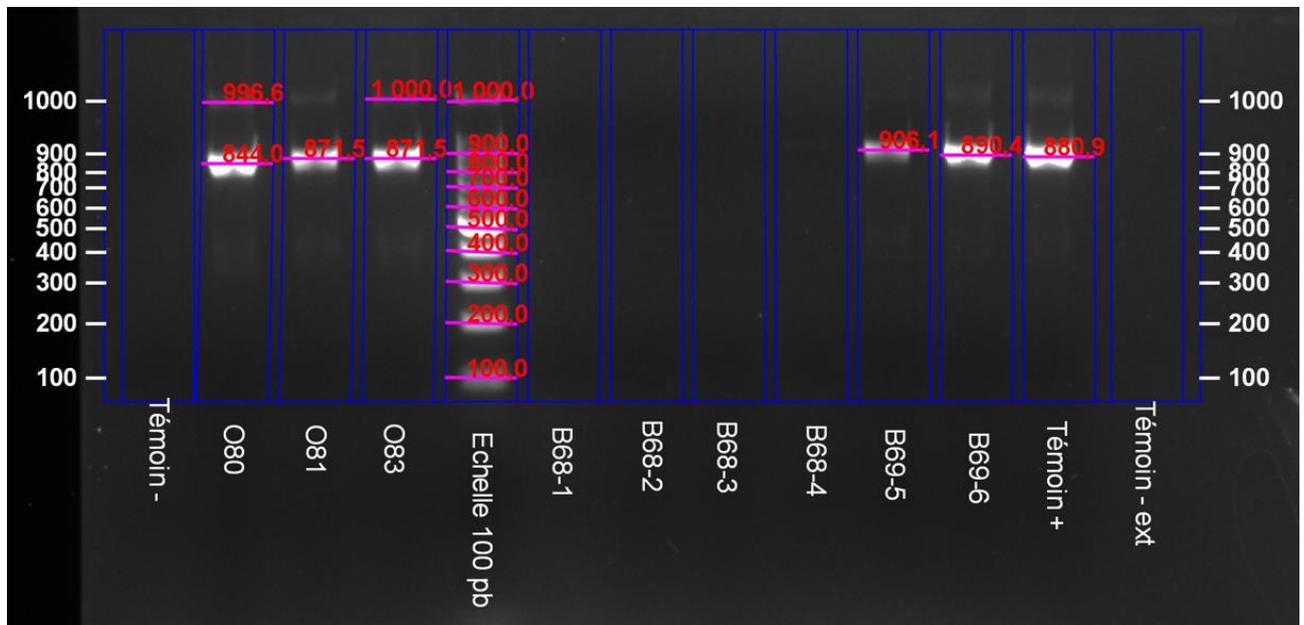
Les deux *runs* d'amplification ont été réalisés au thermocycleur Eppendorf© MasterCycler selon le protocole suivant :

- Heat lid : 112°C
- Dénaturation : 94°C, 10 min
- Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 94°C, 45 s
 - Hybridation : 55°C, 45 s
 - Élongation : 72°C, 1 min
- Élongation finale : 72°C, 5 min

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 2 % TAE au BEt avec un tampon de charge et un marqueur BioRad© 100 pb puis mis à migrer à 100 V pendant une heure. Les gels ont été observés et photographiés par transillumination UV grâce au lecteur BioRad© GelDoc (figure. 29). Les images ont enfin été analysées grâce au logiciel BioRad© ImageLab par comparaison avec le marqueur de taille moléculaire.

Ce protocole a été conçu à partir des travaux de Xiao *et al.*, 1999 et 2001 et Rieux *et al.*, 2013.

Figure 29 - Exemple de gel obtenu après PCR 18S : les bandes d'environ 880 pb correspondent à l'amplicon de l'ADN 18S de *Cryptosporidium* spp. Le témoin positif est une préparation commerciale de la souche *Iowa* de *C. parvum*. Ici, les échantillons O80, O81, O83 et B69 sont positifs à une cryptosporidie. Les échantillons B68 et B69 ont été conditionnés en plusieurs lots lors du prélèvement et manipulés ainsi, mais proviennent chacun du même animal.



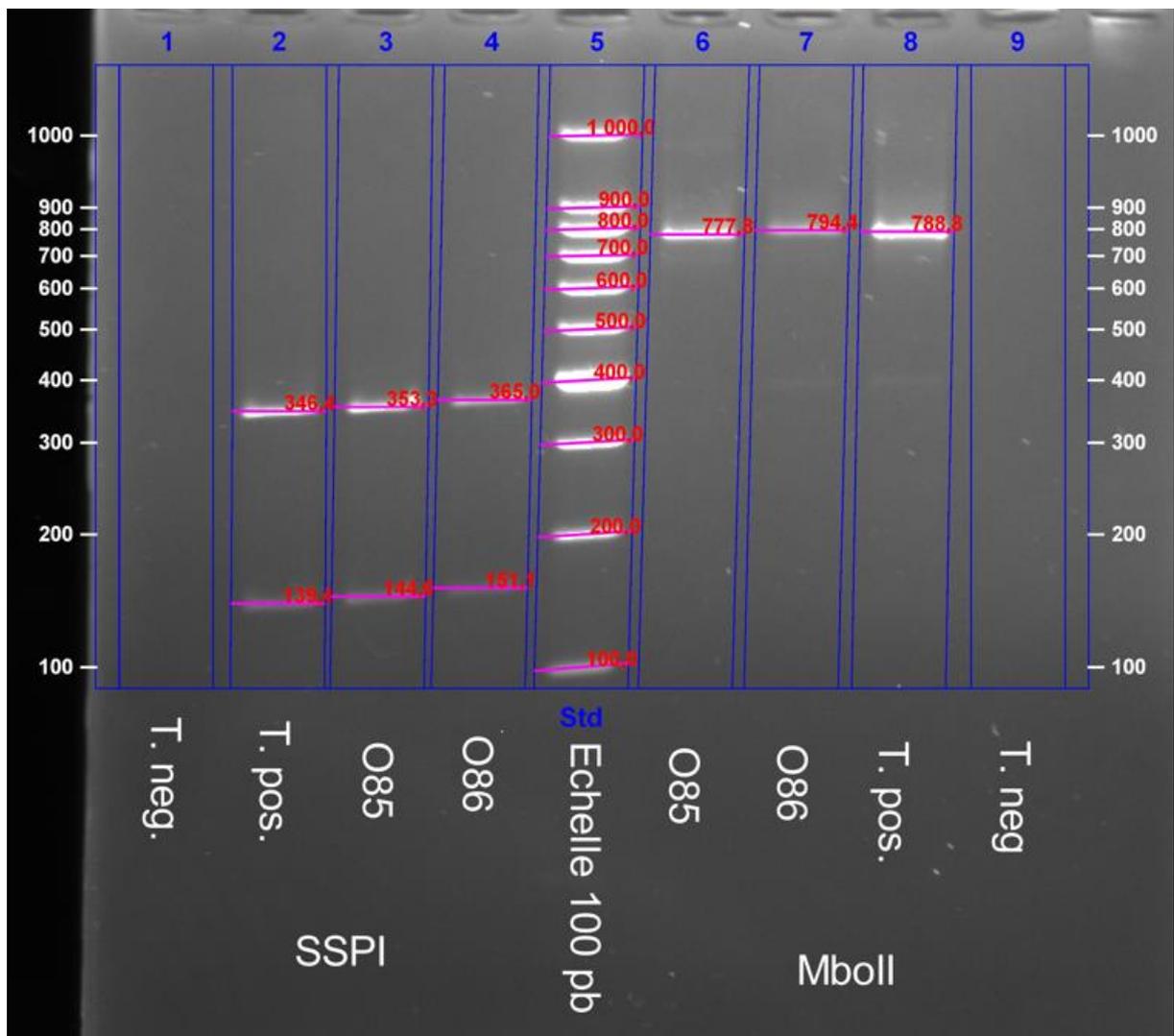
b. RFLP

Une RFLP a été réalisée sur les produits d'amplification de la PCR 18S afin de déterminer l'espèce de *Cryptosporidium* présente dans l'échantillon. Deux enzymes de restrictions ont été utilisées :

MbolI et SspI. Les produits d'amplification ont été mis en contact avec ces enzymes pendant respectivement une et deux heures à une température de 37°C.

Les produits de digestion ont ensuite été déposés sur un gel Metaphor agarose 2 % TAE au BEt avec un tampon de charge et un marqueur BioRad® de 100 pb puis mis à migrer pendant une heure à 70 V et deux heures 100 V. Les gels ont été observés et photographiés par transillumination UV grâce au lecteur BioRad® GelDoc. Les images ont enfin été analysées grâce au logiciel BioRad® ImageLab par comparaison des profils de digestion obtenus avec le marqueur de taille moléculaire et le témoin positif *C. parvum* souche Iowa.

Figure 30 - Exemple de gel obtenu après RFLP : les bandes d'environ 350 pb et 145 pb correspondent au profil de digestion de l'ADN 18S de *Cryptosporidium parvum* par l'enzyme de restriction SspI, les bandes d'environ 785 pb correspondent au profil de digestion de l'ADN de *Cryptosporidium parvum* par l'enzyme de restriction MbolI, les échantillons O85 et O86 présentent un profil de digestion semblable au témoin positif, c'est-à-dire une préparation commerciale d'oocyste de *C. parvum* souche Iowa.



c. PCR GP60

Une seconde PCR nichée a été réalisée sur les échantillons présentant un profil de RFLP compatible avec *C. parvum* dans le but de sous-typer la souche par séquençage du gène de la glycoprotéine 60.

Cette PCR utilisait une Taq-polymérase Thermofisher® Phusion Hot Start 500U et son tampon ainsi qu'un mix de dNTP à 10 mM commercial Thermofisher®. La première amplification utilisait trois amorces Eurofins® 10 mM GP60F1A (5'-ATAGTCTCCGCTGTATTA-3'), GP60F1 (5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3') et GP60R1 (5'-GGAAGGAACGATGTATCT-3'). La seconde amplification utilisait trois amorces Eurofins® 10 µM GP60F2A (5'-TCCGCTGTATTATCAGCC-3'), GP60F2 (5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3') et GP60R2 (5'-GCAGAGGAACCAGCATC-3').

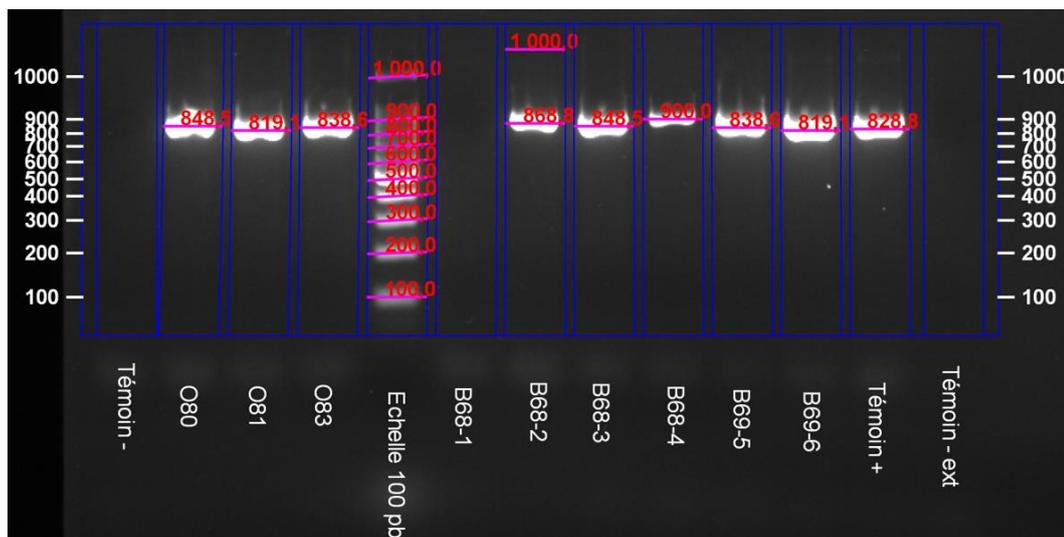
Les deux *runs* d'amplification ont été réalisés au thermocycleur Eppendorf® MasterCycler selon le protocole suivant :

- Heat lid : 112°C
- Dénaturation : 98°C, 30 s
Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 5 s
 - Hybridation : 60°C, 10 s
 - Élongation : 72°C, 15 s
- Élongation finale : 72°C, 1 min

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 2 % TAE au BEt avec un tampon de charge et un marqueur BioRad® 100 pb puis mis à migrer à 100 V pendant une heure. Les gels ont été observés et photographiés par transillumination UV grâce au lecteur BioRad® GelDoc. Les images ont été analysées grâce au logiciel BioRad® ImageLab par comparaison avec le marqueur de taille moléculaire puis les produits d'amplification ont été envoyés au laboratoire Genoscreen® de Lille pour séquençage.

Ce protocole a été conçu à partir des travaux de Alves *et al.*, 2003 ; Gatei *et al.*, 2006 et Follet *et al.*, 2011.

Figure 31 - Exemple de gel obtenu après PCR GP60 : les bandes d'environ 850 pb correspondent à l'amplicon de l'ADN codant pour la GP60 de *Cryptosporidium parvum*. Les échantillons O80, O81, O83, B68 et B69 sont positifs à *C. parvum*.



Les séquences ont enfin été éditées manuellement sur le logiciel BioEdit©. Les séquences consensus ont été extraites puis les motifs répétés ont été comptés manuellement afin de déterminer le sous-type.

B. Recherche du génome de CSpV-1

Cette partie a été réalisée sur tous les échantillons positifs à *Cryptosporidium*.

a. Purification par IMS

Une technique de séparation immunomagnétique (IMS) a été utilisée afin de purifier les échantillons en vue d'une RT-PCR grâce au kit commercial Idexx© Dynabeads. Ce kit utilisait des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps anti-*Cryptosporidium*. Une fois les cryptosporidies fixées aux billes, un portoir magnétique est utilisé afin de rincer minutieusement les oocystes. Ceux-ci sont ensuite relargués en milieu acide. L'intérêt de l'IMS est qu'elle permet d'obtenir une matrice d'extraction très pure et débarrassée de la plupart des contaminants. Son inconvénient est que, dans le cadre d'échantillons très peu concentrés en oocystes, elle peut altérer la sensibilité des techniques moléculaires. Certains échantillons ont ainsi subi l'étape suivante avec et sans IMS.

b. Extraction d'ARN et transcription inverse

Les produits d'IMS obtenus à l'étape précédente ont subi une extraction d'ARN grâce au kit commercial Qiagen© RNeasy. Une fois l'extraction terminée, une transcription inverse a permis d'obtenir l'ADN complémentaire à ces ARN.

La transcription inverse comprenait une phase de lyse de l'ADN résiduel avec une ADNase puis une rétrotranscription proprement dite grâce au kit Thermofisher© Maxima H minus Reverse transcriptase.

c. PCR

- PCR CP

Cette PCR visait à amplifier la séquence du gène de la protéine de capsid de *Cryspovirus*. Une *Taq-polymérase* *ThermoFisher*® *Phusion Hot Start High Fidelity* était utilisée avec un mélange de dNTP à 10 mM et les amorces Eurofins® à 10 µM suivantes : For-5'-TGGTTCCGATTTTACCGGAA-3' et Rev-5'-ACGACAATTAGGACTCAAATGACC-3'. Deux amorces compétitives sont également utilisées : For-5'-TGGTTCCGATTTTACCGGAATGGCCCG-ACAAGCAA-3' et Rev-5'-AACGACAATTAGGACTCAAATGACCGCCTGAATGTTCTCGCG-3'.

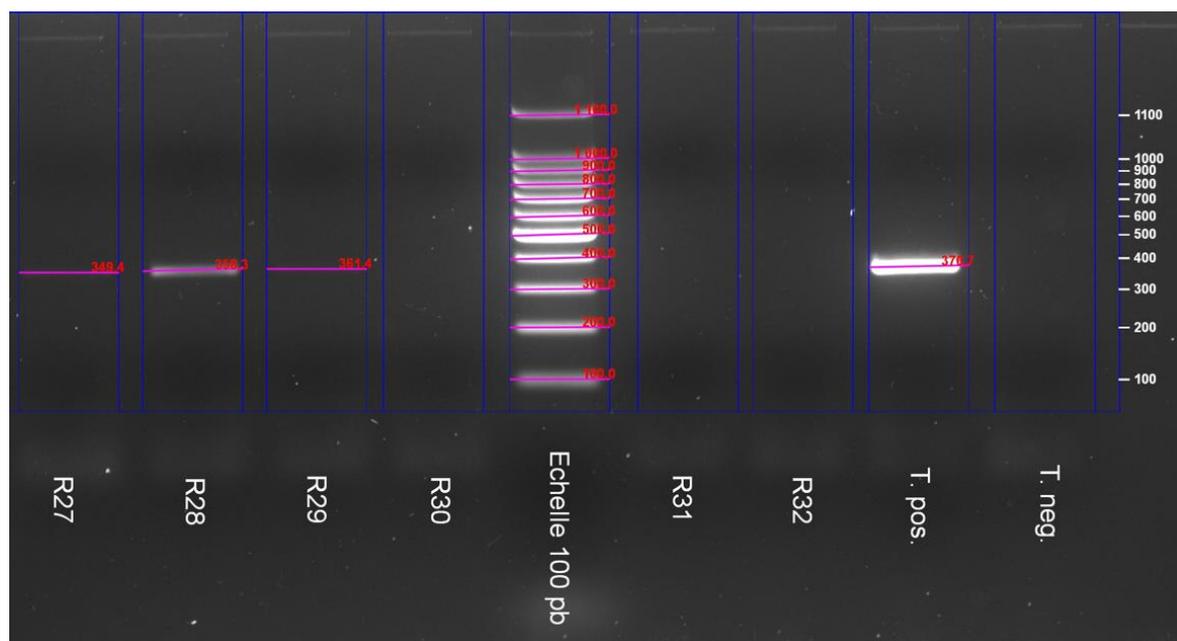
L'amplification a été réalisée au thermocycleur Eppendorf® MasterCycler selon le protocole suivant :

- Dénaturation : 98°C, 3 min
Puis 35 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 10 s
 - Hybridation : 51°C, 30 s
 - Élongation : 72°C, 1 min
- Élongation finale : 72°C, 5 min

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 2 % TAE au BEt avec un tampon de charge et un marqueur BioRad® 100 pb puis mis à migrer à 100 V pendant une heure. Les gels ont été observés et photographiés par transillumination UV grâce au lecteur BioRad® GelDoc. Les images ont enfin été analysées grâce au logiciel BioRad® ImageLab par comparaison avec le marqueur de taille moléculaire.

Ce protocole est adapté des travaux de Jenkins *et al.*, 2015.

Figure 32 - Exemple de gel obtenu après PCR CP : la bande d'environ 360 pb correspond au rétro-amplicon de l'ARN codant pour la protéine de capsid de CSpV-1. Les échantillons R27, R28 et R29 sont positifs à l'ARN codant pour la protéine de capsid de CSpV-1. Le témoin positif était une préparation commerciale d'oocystes de *C. parvum* souche *Iowa* naturellement infectés par CSpV-1.



- *PCR RdRp*

Cette PCR visait à amplifier la séquence du gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante de *Cryspovirus*. Une *Taq-polymérase Thermofisher® Phusion Hot Start High Fidelity* était utilisée avec un mélange de dNTP à 10 mM et les amorces Eurofins® à 10 µM suivantes : For- 5'-TGGGCATATGGTGCTCACTA-3' et Rev- 5'-GCTAAGAGATCGTAGATGTCCA-3'. Deux amorces compétitives étaient également utilisées : For-5'-TGGGCATATGGTGCTCACTATGGCCCGAC-AAGCAA-3' et Rev-5'-GCTAAGAGATCGTAGATGTCCAGCCTGAATGTTCTCGCG3'.

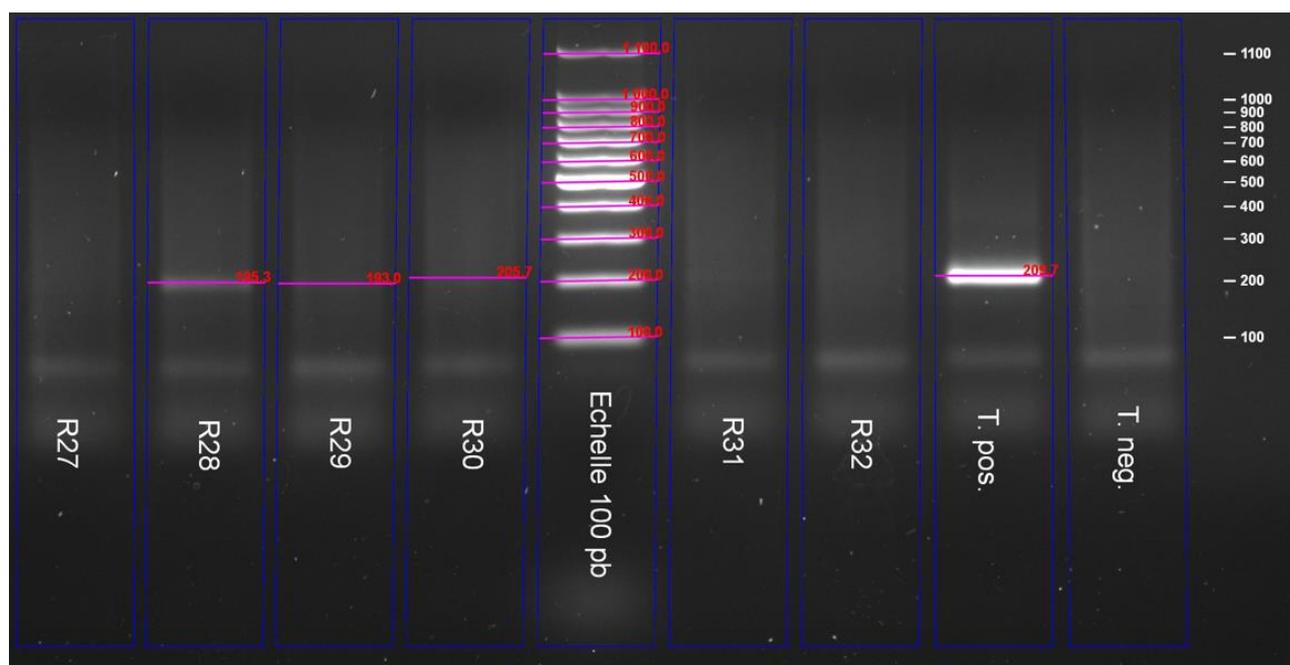
L'amplification a été réalisée au thermocycleur Eppendorf® MasterCycler selon le protocole suivant :

- Dénaturation : 98°C, 3 min
- Puis 35 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 10 s
 - Hybridation : 51°C, 30 s
 - Élongation : 72°C, 1 min
- Élongation finale : 72°C, 5 min

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 2 % TAE au BEt avec un tampon de charge et un marqueur BioRad® 100 pb puis mis à migrer à 100 V pendant une heure. Les gels ont été observés et photographiés par transillumination UV grâce au lecteur BioRad® GelDoc. Les images ont enfin été analysées grâce au logiciel BioRad® ImageLab par comparaison avec le marqueur de taille moléculaire.

Ce protocole est adapté des travaux de Jenkins *et al.*, 2015.

Figure 33 - Exemple de gel obtenu après PCR RdRp : la bande d'environ 200 pb correspond au rétro-amplicon de l'ARN codant pour la RdRp de CSpV-1. Les échantillons R28, R29 et R30 sont positifs à l'ARN codant pour l'ARN-polymérase ARN-dépendante de CSpV-1. Le témoin positif était une préparation commerciale d'oocystes de *C. parvum* souche *lowa* naturellement infectés par CSpV-1.



- *PCR VL*

Cette PCR visait à amplifier le segment dsRNA1 portant le gène de la RdRp et ses séquences non-codante annexes. Une Taq-polymérase *Thermofisher® Phusion Hot Start High Fidelity* était utilisée avec un mélange de dNTP à 10 mM et les amorces Eurofins® à 10 µM suivantes : For-5'-AAGTTTGTCAATATCTATGAGATAC-3' et_Rev-5'-TCCATAAATTTTGTGACTCTG-3'.

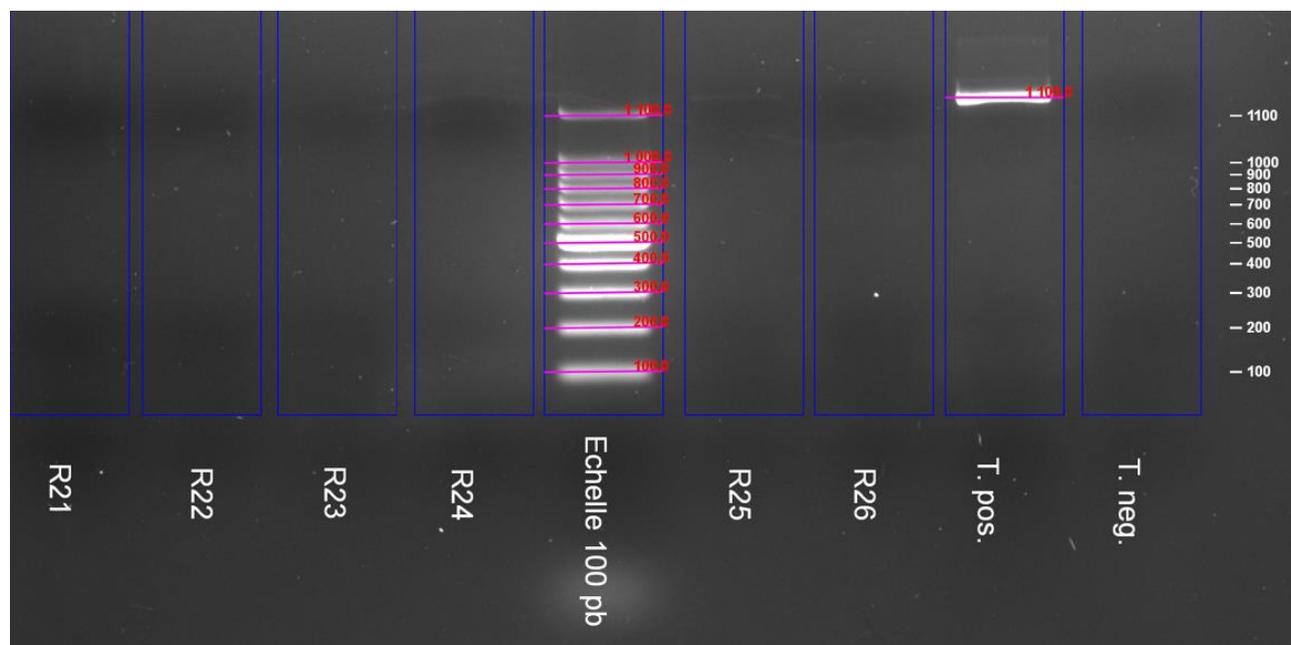
L'amplification a été réalisée au thermocycleur Eppendorf® MasterCycler selon le protocole suivant :

- Dénaturation : 98°C, 3 min
Puis 35 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 10 s
 - Hybridation : gradient de température entre 52°C et 72°C, 30 s
 - Élongation : 72°C, 1 min
- Élongation finale : 72°C, 5 min

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 2 % TAE au BEt avec un tampon de charge et un marqueur BioRad® 100 pb puis mis à migrer à 100 V pendant une heure. Les gels ont été observés et photographiés par transillumination UV grâce au lecteur BioRad® GelDoc. Les images ont été analysées grâce au logiciel BioRad® ImageLab par comparaison avec le marqueur de taille moléculaire, puis les produits d'amplification ont été envoyés au laboratoire Genoscreen® de Lille pour séquençage.

Ce protocole est adapté des travaux de Murakoshi *et al.*, 2016.

Figure 34 - Exemple de gel obtenu après PCR CPVL : la bande d'environ 1 100 pb correspond au rétro-amplicon du fragment long d'ARN de CSpV-1. Aucun des échantillons analysés sur ce gel n'est positif au fragment long de l'ARN de CSpV-1. Le témoin positif était une préparation commerciale d'oocystes de *C. parvum* souche *Iowa* naturellement infectés par CSpV-1.



- *PCR VS*

Cette PCR visait à amplifier le segment dsRNA2 portant le gène de CP et ses séquences non-codantes annexes. Une Taq-polymérase *ThermoFisher® Phusion Hot Start High Fidelity* était utilisée avec un mélange de dNTP à 10 mM et les amorces Eurofins® à 10 µM suivantes : For- 5'-ATTACAAGTTTTGAATCAATAGAG-3' et Rev-5'-ATGGGAGCGATCTGCGCTACAC-3'.

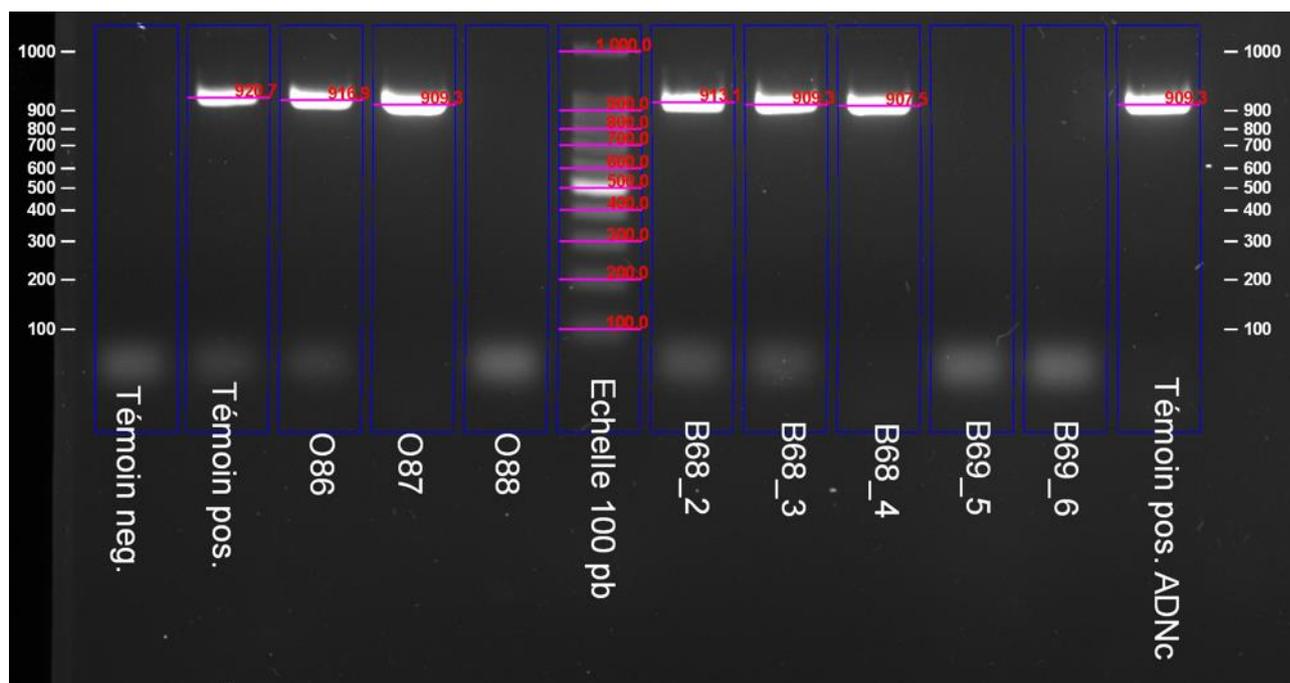
L'amplification a été réalisée au thermocycleur Eppendorf® MasterCycler selon le protocole suivant :

- Dénaturation : 98°C, 3 min
- Puis 35 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 10 s
 - Hybridation : gradient de température entre 52°C et 72°C, 30 s
 - Élongation : 72°C, 1 min
- Élongation finale : 72°C, 5 min

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 2 % TAE au BEt avec un tampon de charge et un marqueur BioRad® 100 pb puis mis à migrer à 100 V pendant une heure. Les gels ont été observés et photographiés par transillumination UV grâce au lecteur BioRad® GelDoc. Les images ont été analysées grâce au logiciel BioRad® ImageLab par comparaison avec le marqueur de taille moléculaire, puis les produits d'amplification ont été envoyés au laboratoire Genoscreen® de Lille pour séquençage.

Ce protocole est adapté des travaux de Murakoshi *et al.*, 2016.

Figure 35 - Exemple de gel obtenu après PCR CPVS : la bande d'environ 910 pb correspond au rétro-amplicon du fragment court d'ARN de CSpV-1. Les échantillons O86, O87 et B68 sont positifs au fragment court de l'ARN de CSpV-1. Le témoin positif était une préparation commerciale d'oocystes de *C. parvum* souche *lowa* naturellement infectés par CSpV-1.



d. qPCR

Une RT-PCR quantitative a été réalisée afin de confirmer les résultats sur les échantillons d'origine humaine. Cette PCR utilisait un prémix commercial ONEGreen© FastqPCR et les amorces Eurofins© suivantes : VirSym (For-5'-TGGTTCCGATTTTACCGGAA-3' et Rev- 5'-ACGACAATTAGGACTCAAATGACC-3') et GAPDH (For-5'-CCTGCACCACCAACTGCTTA-3' et Rev-5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGAG-3').

La PCR en temps réel a été réalisée sur l'appareil Roche© LightCycler 480 selon le cycle suivant :

- Activation : 95°C, 10 min
Puis 45 cycles :
 - Dénaturation : 95°C, 10 s
 - Hybridation et élongation : 60°C, 1 min, simple mesure d'absorbance
- Courbe de fusion : 60°C, 15 s puis maintient à 95°C, mesure d'absorbance continue.

Les résultats obtenus sont analysés à la lumière de l'indicateur Ct fourni par l'automate. Cet indicateur correspond au nombre de cycle nécessaire pour que l'absorbance de l'échantillon soit supérieure au bruit de fond. Les échantillons présentant un Ct supérieur à 36 ont été déclarés négatifs.

C. Analyse génomique des séquences de CSpV-1

Les séquences dsRNA1 (CPVL) et dsRNA2 (CPVS) ont été éditées manuellement grâce au logiciel BioEdit©. Les parties de séquence au profil chromatographique illisible ont été supprimées. Une séquence consensus a été déterminée pour chaque échantillon puis soumise dans la base de données BLAST afin de s'assurer qu'il s'agissait bien de séquences de *Cryspovirus*. Les séquences d'intérêt ont ensuite été alignées pour construire deux matrices de similarités. Les séquences proposées par Adjou *et al.*, 2023 ont été utilisées comme référence.

3. Résultats

A. Recherche et typage de *Cryptosporidium*

Cette partie a été réalisée sur des échantillons d'origine ovine et bovine. Des taux de positivité de 100 % sur les deux échantillons d'origine bovine et de 62,5 % sur les 16 échantillons d'origine ovine ont été obtenus. Le tableau 9 présente ces résultats. L'intégralité des échantillons positifs à *Cryptosporidium* présentait un profil de RFLP compatible avec *C. parvum*.

Tableau 9 - Résultats des analyses de biologie moléculaire visant à rechercher et typer *Cryptosporidium* chez les ruminants

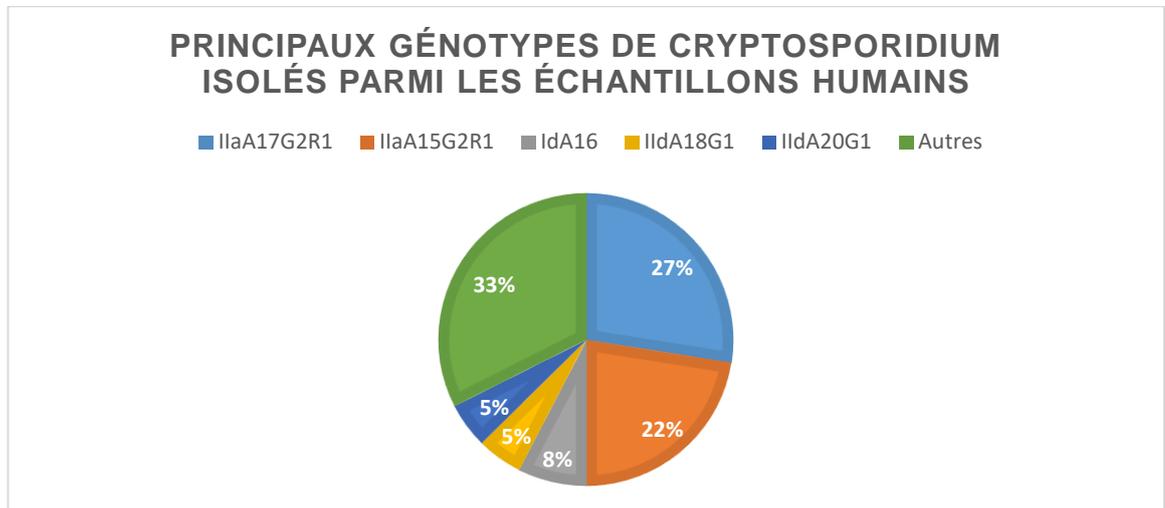
Espèce	Échantillons obtenu	Échantillons positifs en IF (%)	Échantillons positifs en PCR 18S (%)	Échantillons positifs en PCR GP 60 (%)	Total
Bovins	2	2 (100 %)	1 (50 %)	2 (100 %)	2 (100 %)
Ovins	16	10 (62,5 %)	9 (56 %)	9 (56 %)	10 (62,5 %)

Parmi les échantillons positifs en PCR GP60, 100 % des échantillons bovins et 87,5 % des échantillons ovins étaient du sous-type IIaA15G2R1. Un échantillon ovin était du sous-type IIaA19G2R1.

Un échantillon (O88) présentait une concentration trop faible en ADN pour permettre une détermination de l'espèce par RFLP et un sous-typage. Un autre échantillon (O89) n'était pas suffisamment concentré en oocystes pour permettre une détection de l'ADN 18S en PCR.

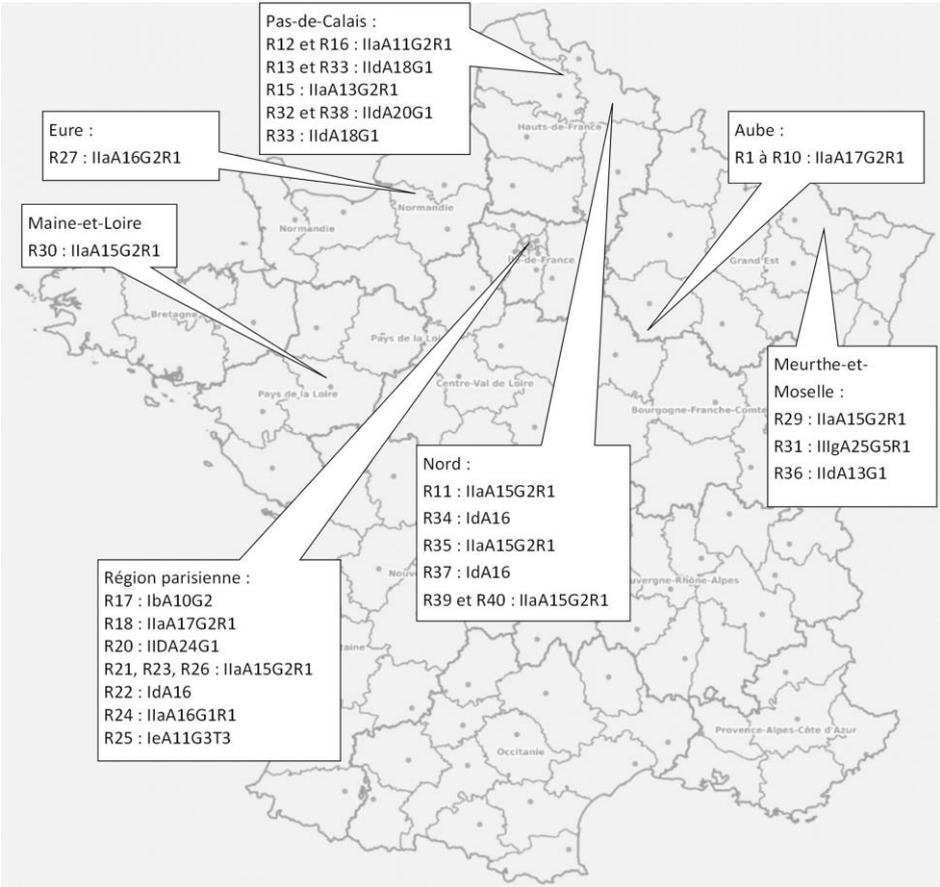
Le diagramme suivant présente les résultats du génotypage des échantillons humains fournis par le CNR de Rouen :

Figure 36 – Résultats du génotypage des échantillons humains : la catégorie « Autres » comprend les génotypes IbA10G2, IaA11G3T3, IIaA11G2R1, IIaA13G2R1, IIaA16G1R1, IIaA16G2R1, IIaA22G1R1, IIdA13G1, IIdA24G1, IIlgA25G5R1.



Les génotypes IIdA17G2R1 et IIdA15G2R1 sont les plus fréquemment isolés en biologie moléculaire et IIdA17G2R1 semblent être associé à une épidémie. La carte suivante permet de comprendre la répartition géographique de ces génotypes parmi les échantillons d'origine humaine.

Figure 37 – Carte épidémiologique des différents génotypes de *Cryptosporidium* identifiés dans les échantillons d’origine humaine



B. Recherche du génome de CSpV-1

Cette partie a été réalisée sur les échantillons décrits ci-dessus déclarés positifs au moins en IF et sur l'intégralité des 35 échantillons humains préalablement déclarés positifs à *C. parvum* et *C. meleagridis* par le CHU de Rouen, les échantillons positifs à *C. hominis* n'ont pas été inclus dans ces résultats. En effet, ceux-ci ne se sont pas révélés positifs à CSpV-1, mais il reste tout à fait possible qu'un autre *Cryspovirus* non encore découvert les infecte.

Un échantillon bovin s'est révélé positif à *Cryspovirus* sur deux. Huit échantillons ovins sur neuf étaient positifs. Trente échantillons humains sur 40 étaient positifs. Le tableau suivant récapitule ces résultats en fonction des PCR déclarées positives.

Tableau 10 - Résultats des PCR visant à détecter la présence de CSpV-1

Espèce	Échantillons analysés		Échantillons positifs en PCR CP après IMS (%)	Échantillons positifs en PCR RdRp après IMS (%)	Échantillons positifs en PCR CPVL (%)		Échantillons positifs en PCR CPVS (%)		Échantillons positifs en qPCR après IMS (%)	Total
	Avant IMS	Après IMS			Avant IMS	Après IMS	Avant IMS	Après IMS		
Bovins	0	2	1 (50 %)	1 (50 %)	/	1 (50 %)	/	1 (50 %)	/	1 (50 %)
Ovins	0	9	8 (89 %)	8 (89 %)	/	8 (89 %)	/	8 (89 %)	/	8 (89 %)
Humains	22	35	19 (54 %)	14 (40 %)	17 (77 %)	13 (37 %)	15 (68 %)	14 (40 %)	25 (71 %)	30 (85 %)

C. Résultats de l'analyse génomique des séquences CPVS et CPVL

L'analyse génomique des séquences des deux fragments d'ARN a permis de construire les arbres phylogénétiques suivants, les données issues des échantillons analysés pour ce travail ont été complétées par celles issues de Adjou *et al.*, 2023, ce qui permet d'avoir un pool d'échantillons plus important. Les échantillons inscrits en rouge correspondent aux échantillons humains fournis par le CNR de Rouen.

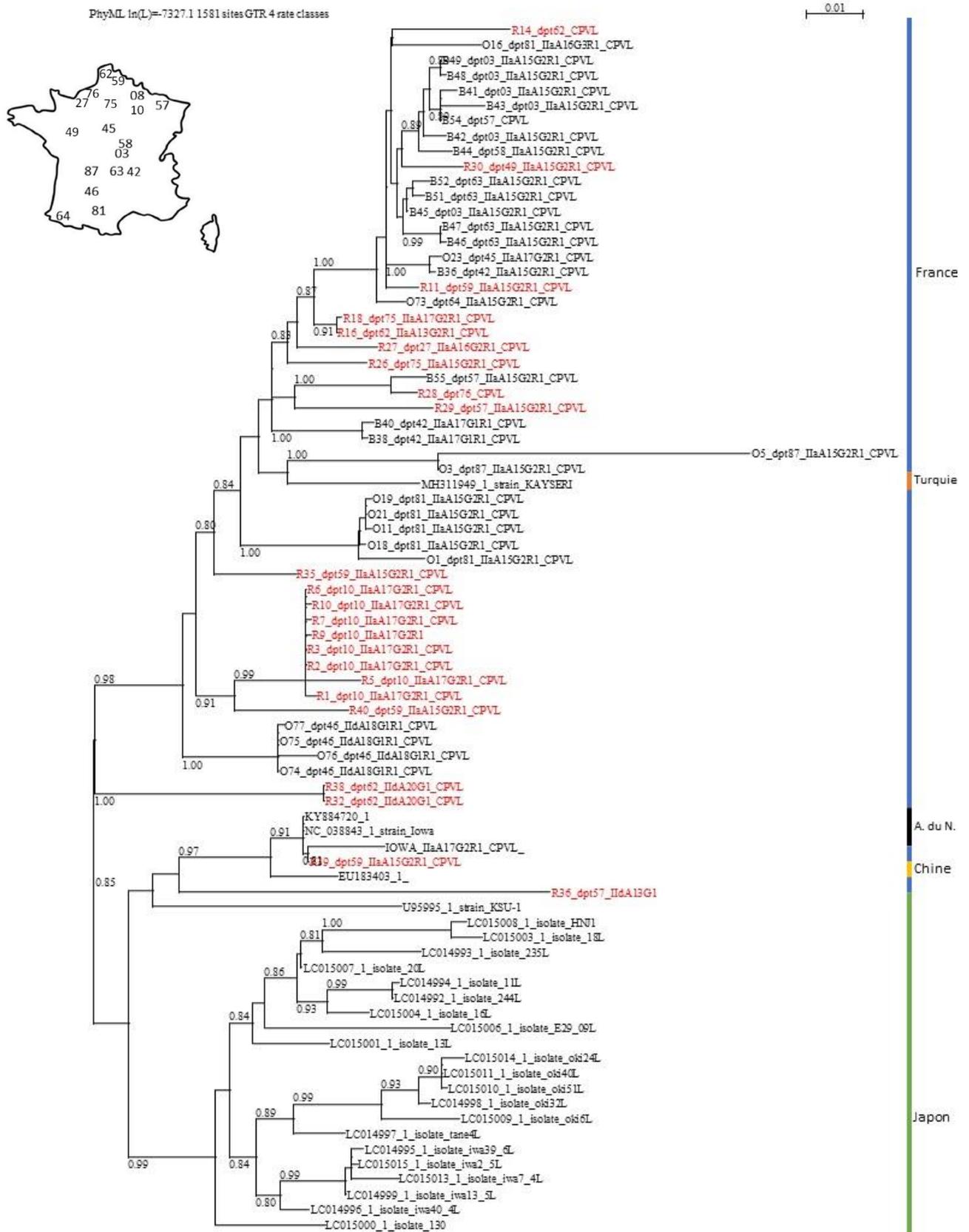


Figure 39 – Arbre phylogénétique construit à partir des séquences CPVL : la carte en encart indique les différents départements d'origine des échantillons, la barre latérale indique les pays d'origine des échantillons, la barre d'échelle montre le nombre de changements de nucléotide, les échantillons sont numérotés séquentiellement, la lettre indique l'espèce d'origine (B : bovin, O : ovin, R : humain), suivi du numéro du département.

4. Discussion

A. Identification de CSpV-1 en France chez l'homme

L'objectif premier de ce travail, à savoir identifier la présence du *Cryspovirus* dans des échantillons humains d'origine française a été rempli. Le nombre de prélèvement analysé est néanmoins encore trop faible pour conclure sur une prévalence à l'échelle nationale. D'autres analyses sur un échantillon plus important sont nécessaires pour connaître plus précisément l'ampleur de la diffusion du virus dans les lignées de *Cryptosporidium* isolées en France. La confirmation de la présence de CSpV-1 chez des cryptosporidies isolées chez l'homme en France est notoire.

Finalement, les taux de prévalence observés (50 à 89 %) au cours des différentes étapes de ce travail sont intermédiaires entre ceux observés par Khramtsov *et al.* ; Murakoshi *et al.* et Berber *et al.* Un taux global de 85 % est obtenu en confondant toutes les espèces, ce qui est très proche des taux observés en 2023 par Adjou *et al.*

B. Analyse épidémiologique

L'analyse épidémiologique, bien que très partielle étant donnée la petite taille de l'échantillon, permet de déterminer plusieurs hypothèses de travail sur la relation entre les cryptosporidies et leur symbiote viral.

a. Circulation des sous-types de *Cryptosporidium* chez l'homme et les ruminants en France

Concernant *C. hominis*, le sous-type qui circule le plus chez les humains en Europe est IbA10G2 (Cacciò et Chalmers, 2016). Parmi les cinq échantillons positifs pour cette espèce, un seul était effectivement de ce sous-type. Le sous-type le plus représenté était IdA16. Ce sous-type est assez peu documenté mais semble avoir été à l'origine d'épidémies sporadiques en Asie et en Océanie (Grossman *et al.*, 2019). Il est difficile de conclure sur une explication à ce phénomène sans rompre l'anonymat des données humaines. Le dernier sous-type de *C. hominis* représenté était A11G3T3. Ce sous-type est le plus fréquent en Israël et semble être à l'origine d'une plus forte morbidité (Grossman *et al.*, 2019). Ces données sont difficiles à interpréter sans obtenir plus d'informations sur la source des prélèvements (voyages, contact avec des ruminants, sévérité des symptômes), on peut néanmoins raisonnablement penser que les personnes atteintes de ces sous-types « exotiques » ont pu voyager à l'extérieur du continent européen ou ont été en contact avec des voyageurs.

Concernant *C. parvum*, dans les pays industrialisés, les sous-types du groupe IIa et plus particulièrement IIaA15G2R1 sont dominants (Feng *et al.*, 2013). Cette tendance est vérifiée dans nos échantillons ovins et bovins, cependant, chez l'homme, le sous-type le plus isolé et IIaA17G2R1, incarné par l'épidémie dans le département de l'Aube arrive en première position. Il est probable qu'un événement tel que cette épidémie, qui représente un quart du total des échantillons analysés ait pu influencer ce résultat. Ces deux sous-types sont zoonotiques et si IIaA15G2R1 est très majoritaire chez les ruminants, IIaA17G2R1 est également isolé sporadiquement (Göhring *et al.*, 2022). Ceci ne permet donc pas vraiment de conclure sur l'origine de la contamination humaine. D'autres sous-types sont représentés de manière marginale, particulièrement en région parisienne où la diversité des sous-types est la plus forte. Cette diversité peut être expliquée par la tendance plus forte à la mobilité et aux migrations depuis et vers la capitale française, ces sous-types ont pu

être apporté par des aliments ou des boissons contaminés, ou encore par une personne malade. L'hypothèse d'une importation de ces sous-types moins répandus en France par des animaux est beaucoup moins probables étant donné la faible mobilité des ruminants depuis et vers l'Union Européenne.

b. Circulation du *Cryspovirus* chez les *cryptosporidies* isolées chez l'homme et les ruminants en France

Les arbres phylogénétiques, associés aux cartes, nous permettent de constater que les clades humains (indiqués en rouge) sont très bien répartis au sein des échantillons d'autres espèces, on observe également une branche portant plusieurs échantillons très groupés et issus d'une seule et même épidémie dans le département de l'Aube (10). Il semble alors pertinent de se demander si les séquences de CSpV-1 ne pourraient pas être un très bon indicateur épidémiologique pour suivre les différents clades de *Cryptosporidies* plus finement qu'avec un simple génotypage.

Il est par exemple imaginable de déterminer l'origine d'une contamination humaine (cas sporadique ou épidémie) grâce à la séquence de son *Cryspovirus* en la plaçant dans un arbre phylogénétique. Une plus forte proximité avec des clades isolés chez l'humain ou chez les ruminants permettrait d'aider aux enquêtes épidémiologiques et d'élucider plus facilement une origine zoonotique ou non.

Les résultats géographiques de la répartition des génomes de CSpV-1 et de *Cryptosporidium* indiquent bien une tendance à la corrélation entre la proximité des génomes de l'hôte et du symbiote selon l'origine. Cette tendance est plus marquée chez les animaux de production que chez l'être humain, en effet, les humains ont tendance à être plus mobiles sur le territoire, ce qui favorise un brassage des différentes lignées de *Cryptosporidium*.

On observe également que des *cryptosporidies* d'un même sous-type tendent à présenter des séquences de *Cryspovirus* proches, ce qui est à mettre en relation avec le mode de transmission du virus entre hôtes par transmission verticale exclusive. On remarque également une tendance forte au regroupement des génotypes IIa et IIc au sein de deux ensembles distincts dont les relations de parenté semblent indiquer une possible ancestralité de IIc par rapport à IIa.

Les échantillons R39 et R36 sont très intéressants, en effet, ceux-ci sont totalement à l'écart des autres échantillons français sur les arbres et présentent plus de similarités avec des clades nord-américains. On pourrait l'expliquer par un possible voyage de ces deux patients en Amérique du Nord, sans pour autant pouvoir le confirmer, puisque nous n'avons aucune information sur les patients (anonymisés).

Ces résultats sont très cohérents avec ceux de Murakoshi *et al.* et Berber *et al.* qui relevaient déjà cette tendance au sein de leurs pays respectifs.

Une analyse à l'échelle continentale peut également être proposée grâce aux arbres phylogénétiques (Figures 38 et 39), qui suggèrent que les isolats français sont globalement distincts des isolats asiatiques (turcs et japonais), ce qui indique encore une utilité potentielle du *Cryspovirus* en tant que « mouchard épidémiologique ».

c. Relation entre présence du virus et pathogénicité du parasite : perspectives

Il est malaisé de proposer une analyse sur ce point en absence de données sur la sévérité des symptômes pour chaque prélèvement et il serait malvenu d'émettre des conclusions à ce stade de

la recherche, néanmoins, il apparaît que les prélèvements issus d'une épidémie ou d'un foyer en élevage sont infectés par CSpV-1, alors que les résultats sont plus disparates sur des cas ponctuels. On peut alors se demander s'il s'agit bien d'une manifestation épidémiologique des découvertes de Jenkins *et al.*, 2015 sur la corrélation entre charge parasitaire et présence du virus. Pour ce faire, nous proposons des perspectives pour de futures recherches sur le sujet. Notre étude ne permet cependant pas de conclure sur un effet du virus sur la pathogénicité du parasite.

Il serait très intéressant de poursuivre ce travail par des expériences de culture cellulaire. Les matrices de culture les plus utilisées pour les cryptosporidies sont les cellules d'embryon de poulet et les cellules HCT-8 (cellules d'adénocarcinome iléocæcal humain). Il est quasiment impossible de réaliser l'intégralité du cycle reproductif de *Cryptosporidium in vitro*, celui-ci s'arrêtant en général avant de former des oocystes (Karanis, 2018). Nous pouvons imaginer un protocole partant de l'inoculation de formes infectantes de diverses souches de *Cryptosporidium* sur un tapis cellulaire adapté, puis une mise en culture. L'objectif sera de comparer la virulence des souches par comptage des parasites ayant envahi le tapis. L'expérience la plus valorisable serait de comparer la virulence de deux souches du même sous-type, l'une étant infecté par CSpV-1, l'autre non. Néanmoins, comme expliqué précédemment, ces souches semblent difficiles à obtenir et beaucoup plus rares, avec un risque non négligeable de faux-négatif du test. Il apparaît donc envisageable d'utiliser deux lignées infectées par le *Cryspovirus* mais plutôt d'inactiver pour l'un d'elles le virus. Un antiviral bien connu, facile d'accès, peu toxique et très actif sur les virus à ARN sans transcriptase inverse est la ribavirine.

Conclusion

Les cryptosporidioses sont des maladies parasitaires zoonotiques d'importance majeure en santé humaine comme en santé animale. Elles sont à l'origine de pertes économiques majeures en élevage de ruminants.

La découverte d'un symbiote viral chez *Cryptosporidium* a rebattu les cartes de la compréhension de la pathogénie et de l'épidémiologie de ce parasite. Nous avons montré que le *Cryspovirus* est très répandu parmi les lignées de cryptosporidies en France, et ce dans plusieurs espèces (humain, ovin, bovin). Il s'agit de la première description du CSpV-1 dans des cryptosporidies isolées chez l'homme en France.

Ce *Cryspovirus* est un virus à ARN qui présente un mode de transmission tout à fait original, par voie verticale exclusivement, et ne possède pas de système d'invasion de son hôte parasite. La présence de ce virus dans les cryptosporidies semble être à l'origine d'une fécondité et d'une infectiosité majorée, sans que le mode d'action précis ne soit pour l'instant clairement identifié. L'hypothèse la plus probable est une action du virus sur la voie de l'interféron gamma chez l'hôte mammifère qui permet au parasite d'échapper au système immunitaire.

La prévalence observée de CSpV-1 au cours des manipulations était de près de 85 % toutes espèces confondues. Nous avons proposé des perspectives de cultures cellulaires qui permettraient de quantifier l'effet de la contamination par *Cryspovirus* sur la pathogénicité de *C. parvum*.

Ce travail a également permis de proposer un état des lieux partiel sur la circulation des sous-types de *C. parvum* et *C. hominis* en France. Il en ressort une tendance cohérente avec les données acquise de la science en ce qui concerne *C. parvum* avec une forte dominance de sous-types européens, alors que pour *C. hominis*, des sous-types exotiques semblent être prépondérants. Ces données sont malgré tout à interpréter avec une grande prudence étant donné la faible taille de l'échantillon et le manque d'information sur les prélèvements.

Liste des références bibliographiques

- ADJOU, K.T., CHEVILLOT, A., LUCAS, P., *et al.* (2023) First identification of *Cryptosporidium parvum* virus 1 (CSpV1) in various subtypes of *Cryptosporidium parvum* from diarrheic calves, lambs and goat kids from France. *Veterinary Research* vol. 54, n° 1, p. 66. [<https://doi.org/10.1186/s13567-023-01196-4>]
- AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL (2022) Gabbrovet Multi 140 mg/mL solution pour administration dans l'eau de boisson ou le lait pour des bovins pré-ruminants et des porcins. *In iRCP*. [<https://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=GABBROVET+MULTI+140+MG%2fML+SOLUTION+POUR+ADMINISTRATION+DANS+L%27EAU+DE+BOISSON+OU+LE+LAIT+POUR+DES+BOVINS+PRE-RUMINANTS+ET+DES+PORCINS>] (consulté le 21/07/2023).
- 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>]
- ANDERSON, B.C. (1985) Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. *American Journal of Public Health* vol. 75, n° 12, p. 1433-1434. [<https://doi.org/10.2105/ajph.75.12.1433>]
- ANGUS, K.W., BLEWETT, D.A., MOREDUN RESEARCH INSTITUTE (Éd.) (1989) *Cryptosporidiosis: proceedings of the first international workshop: 7-8 September 1988. Edinburgh, Scotland, U.K., Moredun Research Institute.*
- ARGENZIO, R.A., LECCE, J., POWELL, D.W. (1993) Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. *Gastroenterology* vol. 104, n° 2, p. 440-447. [[https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90412-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90412-6)]
- BERBER, E., ŞİMŞEK, E., ÇANAKOĞLU, N., *et al.* (2021) Newly identified *Cryptosporidium parvum* virus-1 from newborn calf diarrhoea in Turkey. *Transboundary and Emerging Diseases* vol. 68, n° 4, p. 2571-2580. [<https://doi.org/10.1111/tbed.13929>]
- CACCIÒ, S.M., CHALMERS, R.M. (2016) Human cryptosporidiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* vol. 22, n° 6, p. 471-480. [<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.021>]
- CACCIÒ, S.M., WIDMER, G. (Éd.) (2014) *Cryptosporidium: parasite and disease*. Vienna, Springer. [<https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1562-6>]
- CAMPBELL, I., TZIPORI, A., HUTCHISON, G., *et al.* (1982) Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. *Veterinary Record* vol. 111, n° 18, p. 414-415. [<https://doi.org/10.1136/vr.111.18.414>]
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (2019) Cryptosporidiosis. *In DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*. [<https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>] (consulté le 28/10/2022).
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1982) Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* vol. 31, n° 44, p. 589-592.
- CHALMERS, R.M., DAVIES, A.P. (2010) Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology* vol. 124, n° 1, p. 138-146. [<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003>]

- CHARTIER, C., PARAUD, C. (2010) La cryptosporidiose des ruminants. *Bulletin des G.T.V.* n° 52, p. 83-92.
- CHERMETTE, R., BOUFASSA-OUZROUT, S. (1988) Cryptosporidiose : une maladie animale et humaine cosmopolite, 2e éd. rev. et augm., Série technique. Paris, OIE.
- DE GRAAF, D.C., VANOPDENBOSCH, E., ORTEGA-MORA, L.M., *et al.* (1999) A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology* vol. 29, n° 8, p. 1269-1287. [[https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00076-4](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00076-4)]
- DENG, S., HE, W., GONG, A.-Y., *et al.* (2023) *Cryptosporidium* uses CSpV1 to activate host type I interferon and attenuate antiparasitic defenses. *Nature Communications* vol. 14, n° 1, p. 1456. [<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37129-0>]
- DHAL, A.K., PANDA, C., YUN, S.-I., *et al.* (2022) An update on *Cryptosporidium* biology and therapeutic avenues. *Journal of Parasitic Diseases* vol. 46, n° 3, p. 923-939. [<https://doi.org/10.1007/s12639-022-01510-5>]
- 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>]
- ENGLISH, E.D., GUÉRIN, A., TANDEL, J., *et al.* (2022) Live imaging of the *Cryptosporidium parvum* life cycle reveals direct development of male and female gametes from type I meronts. *PLoS biology* vol. 20, n° 4, p. e3001604. [<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001604>]
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2018) Halocur. In *European Medicines Agency*. [<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/halocur>] (consulté le 21/07/2023).
- EUZÉBY, J. (2008) Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Paris, Tec & Doc Lavoisier.
- FAYER, R. (2010) Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology* vol. 124, n° 1, p. 90-97. [<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.005>]
- FAYER, R. (2004) *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* vol. 126, n° 1-2, p. 37-56. [<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.004>]
- FAYER, R. (Éd.) (1997) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, Rev. ed. Boca Raton New York London, CRC Press.
- FAYER, R., XIAO, L. (Éd.) (2008) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2nd. Boca Raton : [London], CRC Press ; IWA Pub.
- FENG, Y., TORRES, E., LI, N., *et al.* (2013) Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. *International Journal for Parasitology* vol. 43, n° 14, p. 1141-1147. [<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.002>]
- FOLLET, J., GUYOT, K., LERUSTE, H., *et al.* (2011) *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Veterinary Research* vol. 42, n° 1, p. 116. [<https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-116>]
- GALLIMORE, C.I., GREEN, J., CASEMORE, D.P., *et al.* (1995) Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. *Archives of virology* vol. 140, n° 7, p. 1275-1278. [<https://doi.org/10.1007/bf01322752>]
- GATEI, W., HART, C.A., GILMAN, R.H., *et al.* (2006) Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* vol. 53 Suppl 1, p. S43-48. [<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00169.x>]

- GERACE, E., LO PRESTI, V.D.M., BIONDO, C. (2019) *Cryptosporidium* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, and Differential Diagnosis. *European Journal of Microbiology & Immunology* vol. 9, n° 4, p. 119-123. [<https://doi.org/10.1556/1886.2019.00019>]
- GHECHAM, M. (2012) Cryptosporidiose chez des chevreaux. *In Vétofocus*. [<http://www.vetofocus.com>] (consulté le 16/11/2022).
- GÖHRING, F., LENDNER, M., DAUGSCHIES, A. (2022) Distribution of *Cryptosporidium parvum* subgenotypes in pre-weaned calves in Germany. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports* vol. 36, p. 100806. [<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100806>]
- GRAHAM, M.L., LI, M., GONG, A.-Y., *et al.* (2023) *Cryptosporidium parvum* hijacks a host's long noncoding RNA U90926 to evade intestinal epithelial cell-autonomous antiparasitic defense. *Frontiers in Immunology* vol. 14, p. 1205468. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1205468>]
- GROSSMAN, T., KEN-DROR, S., PAVLOTZKY, E., *et al.* (2019) Molecular typing of *Cryptosporidium* in Israel. *PLOS ONE* vol. 14, n° 9, p. e0219977. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219977>]
- GUERRANT, C.A., WARREN, R.L. (2007) Clinical Disease and Pathology. *In Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 2^e. Boca Raton, CRC Press, p. 235-253.
- HEINE, J., POHLENZ, J.F., MOON, H.W., *et al.* (1984) Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 150, n° 5, p. 768-775. [<https://doi.org/10.1093/infdis/150.5.768>]
- HEMPHILL, A., MUELLER, J., ESPOSITO, M. (2006) Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* vol. 7, n° 7, p. 953-964. [<https://doi.org/10.1517/14656566.7.7.953>]
- HERNANDEZ, J., LACKNER, A., AYE, P., *et al.* (2007) Substance P is responsible for physiological alterations such as increased chloride ion secretion and glucose malabsorption in cryptosporidiosis. *Infection and Immunity* vol. 75, n° 3, p. 1137-1143. [<https://doi.org/10.1128/IAI.01738-05>]
- HULO, C., DE CASTRO, E., MASSON, P., *et al.* (2011) ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research* vol. 39, n° suppl_1, p. D576-D582. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>]
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TOXONOMY OF VIRUSES (2022) Current ICTV Taxonomy Release. [<https://ictv.global/taxonomy>] (consulté le 26/10/2022).
- ITIS (2013) Integrated Taxonomic Information System. *In ITIS*. [<https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>] (consulté le 26/10/2022).
- JENKINS, M.B., EAGLESHAM, B.S., ANTHONY, L.C., *et al.* (2010) Significance of Wall Structure, Macromolecular Composition, and Surface Polymers to the Survival and Transport of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 76, n° 6, p. 1926-1934. [<https://doi.org/10.1128/AEM.02295-09>]
- JENKINS, M.C., HIGGINS, J., ABRAHANTE, J.E., *et al.* (2008) Fecundity of *Cryptosporidium parvum* is correlated with intracellular levels of the viral symbiont CPV. *International Journal for Parasitology* vol. 38, n° 8-9, p. 1051-1055. [<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.005>]
- JENKINS, M.C., O'BRIEN, C.N., SANTIN, M., *et al.* (2015) Changes in the levels of *Cryspovirus* during in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research* vol. 114, n° 6, p. 2063-2068. [<https://doi.org/10.1007/s00436-015-4390-6>]
- KARANIS, P. (2018) The truth about in vitro culture of *Cryptosporidium* species. *Parasitology* vol. 145, n° 7, p. 855-864. [<https://doi.org/10.1017/S0031182017001937>]

- KHRAMTSOV, N.V., CHUNG, P.A., DYKSTRA, C.C., *et al.* (2000) Presence of double-stranded RNAs in human and calf isolates of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Parasitology* vol. 86, n° 2, p. 275-282. [[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0275:PODSRI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0275:PODSRI]2.0.CO;2)]
- KHRAMTSOV, N.V., UPTON, S.J. (2000) Association of RNA polymerase complexes of the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum* with virus-like particles: heterogeneous system. *Journal of Virology* vol. 74, n° 13, p. 5788-5795. [<https://doi.org/10.1128/jvi.74.13.5788-5795.2000>]
- KHRAMTSOV, N.V., WOODS, K.M., NESTERENKO, M.V., *et al.* (1997) Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Molecular Microbiology* vol. 26, n° 2, p. 289-300. [<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5721933.x>]
- KNIEL, K.E., HIGGINS, J.A., TROUT, J.M., *et al.* (2004) Characterization and potential use of a *Cryptosporidium parvum* virus (CPV) antigen for detecting *C. parvum* oocysts. *Journal of Microbiological Methods* vol. 58, n° 2, p. 189-195. [<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.03.007>]
- KNIEL, K.E., JENKINS, M.C. (2005) Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts on fresh vegetables and 1 herbs using antibodies specific for a *Cryptosporidium parvum* viral antigen. *Journal of Food Protection* vol. 68, n° 5, p. 1093-1096. [<https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.5.1093>]
- KORICH, D.G., MEAD, J.R., MADORE, M.S., *et al.* (1990) Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 56, n° 5, p. 1423-1428. [<https://doi.org/10.1128/aem.56.5.1423-1428.1990>]
- LAURENT, F., KAGNOFF, M.F., SAVIDGE, T.C., *et al.* (1998) Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *Infection and Immunity* vol. 66, n° 4, p. 1787-1790. [<https://doi.org/10.1128/IAI.66.4.1787-1790.1998>]
- LECOINTRE, G., LE GUYADER, H., VISSET, D. (2016) Classification phylogénétique du vivant. Tome 1, 4e édition. Paris, Belin Éditions.
- LEITCH, G.J., HE, Q. (2011) Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of Biomedical Research* vol. 25, n° 1, p. 1-16. [[https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60001-8](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60001-8)]
- LEVINE, N.D. (1984) Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). *The Journal of Protozoology* vol. 31, n° 1, p. 94-98. [<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb04296.x>]
- MANENT, M. (2014) Moyens de lutte thérapeutique contre la cryptosporidiose : actualités et perspectives. Thèse de médecine vétérinaire. Maisons-Alfort, École nationale vétérinaire d'Alfort.
- MEISEL, J.L., PERERA, D.R., MELIGRO, C., *et al.* (1976) Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* vol. 70, n° 6, p. 1156-1160.
- MELE, R., GOMEZ MORALES, M.A., TOSINI, F., *et al.* (2004) *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infection and Immunity* vol. 72, n° 10, p. 6061-6067. [<https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6061-6067.2004>]
- MURAKOSHI, F., ICHIKAWA-SEKI, M., AITA, J., *et al.* (2016) Molecular epidemiological analyses of *Cryptosporidium parvum* virus 1 (CSpV1), a symbiotic virus of *Cryptosporidium parvum*, in Japan. *Virus Research* vol. 211, p. 69-72. [<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.021>]

- NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH (2023a) 7-bromo-6-chloro-3-[3-[(3R)-3-hydroxy-2-piperidyl]-2-oxo-propyl]quinazolin-4-one; 2-hydroxypropanoic acid. *In PubChem*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62895] (consulté le 31/07/2023).
- NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH (2023b) Paromomycin. *In PubChem*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/165580] (consulté le 31/07/2023).
- NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH (2023c) Nitazoxanide. *In PubChem*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/41684] (consulté le 31/07/2023).
- NIBERT, M.L., WOODS, K.M., UPTON, S.J., *et al.* (2009) *Cryspovirus*: a new genus of protozoan viruses in the family *Partitiviridae*. *Archives of Virology* vol. 154, n° 12, p. 1959-1965. [https://doi.org/10.1007/s00705-009-0513-7]
- NIME, F.A., BUREK, J.D., PAGE, D.L., *et al.* (1976) Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* vol. 70, n° 4, p. 592-598.
- O'DONOGHUE, P.J. (1995) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology* vol. 25, n° 2, p. 139-195. [https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)E0059-V]
- PANCIERA, R.J., THOMASSEN, R.W., GARNER, F.M. (1971) Cryptosporidial Infection in a Calf. *Veterinary Pathology* vol. 8, n° 5-6, p. 479-484. [https://doi.org/10.1177/0300985871008005-00610]
- PEETERS, J.E., MAZÁS, E.A., MASSCHELEIN, W.J., *et al.* (1989) Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 55, n° 6, p. 1519-1522. [https://doi.org/10.1128/aem.55.6.1519-1522.1989]
- RIEUX, A., CHARTIER, C., PORS, I., *et al.* (2013) Dynamics of excretion and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates in pre-weaned French beef calves. *Veterinary Parasitology* vol. 195, n° 1-2, p. 169-172. [https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.043]
- ROBERTSON, L.J., CAMPBELL, A.T., SMITH, H.V. (1992) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 58, n° 11, p. 3494-3500. [https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3494-3500.1992]
- SANTÍN, M., TROUT, J.M., FAYER, R. (2008) A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology* vol. 155, n° 1-2, p. 15-23. [https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.018]
- ŠLAPETA, J. (2013) Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology* vol. 43, n° 12-13, p. 957-970. [https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.005]
- SLAVIN, D. (1955) *Cryptosporidium meleagridis* (Sp. Nov.). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* vol. 65, p. 262-IN23. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742(55)80025-2]
- SMITH, H.V., NICHOLS, R.A.B., GRIMASON, A.M. (2005) *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology* vol. 21, n° 3, p. 133-142. [https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.01.007]
- SUNDERMANN, C.A., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L. (1987) In vitro excystation of *Cryptosporidium baileyi* from chickens. *The Journal of Protozoology* vol. 34, n° 1, p. 28-30. [https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03126.x]
- THE KOREAN SOCIETY FOR PARASITOLOGY (2003) Web Atlas of Medical Parasitology. *In Web Atlas of Medical Parasitology*. [http://atlas.or.kr/index.html] (consulté le 31/10/2022).
- TYZZER, E.E. (1907) A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Experimental Biology and Medicine* vol. 5, n° 1, p. 12-13. [https://doi.org/10.3181/00379727-5-5]

- TZIPORI, S. (1983) Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews* vol. 47, n° 1, p. 84-96. [<https://doi.org/10.1128/mr.47.1.84-96.1983>]
- TZIPORI, S., WIDMER, G. (2008) A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology* vol. 24, n° 4, p. 184-189. [<https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.01.002>]
- UMEMIYA, R., FUKUDA, M., FUJISAKI, K., *et al.* (2005) Electron microscopic observation of the invasion process of *Cryptosporidium parvum* in severe combined immunodeficiency mice. *Journal of Parasitology* vol. 91, n° 5, p. 1034-1039. [<https://doi.org/10.1645/GE-508R.1>]
- VAINIO, E.J., CHIBA, S., GHABRIAL, S.A., *et al.* (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Partitiviridae. *The Journal of General Virology* vol. 99, n° 1, p. 17-18. [<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000985>]
- VALIGUROVÁ, A., JIRKŮ, M., KOUDELA, B., *et al.* (2008) *Cryptosporidia*: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for Parasitology* vol. 38, n° 8-9, p. 913-922. [<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.003>]
- XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., *et al.* (2004) *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 17, n° 1, p. 72-97. [<https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.72-97.2004>]
- XIAO, L., MORGAN, U.M., LIMOR, J., *et al.* (1999) Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 65, n° 8, p. 3386-3391. [<https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3386-3391.1999>]
- XIAO, L., RYAN, U., FENG, Y.Y. (Éd.) (2015) Biology of foodborne parasites, Food microbiology series. Boca Raton, CRC press.
- XIAO, L., SINGH, A., LIMOR, J., *et al.* (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 67, n° 3, p. 1097-1101. [<https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1097-1101.2001>]
- ZAHEDI, A., RYAN, U. (2020) *Cryptosporidium* – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Research in Veterinary Science* vol. 132, p. 500-512. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.002>]

Annexe 1 : protocole d'immunofluorescence directe

MARQUAGE PAR IMMUNOFLUORESCENCE (IF) DIRECTE ET QUANTIFICATION DES OOCYSTES DE *CRYPTOSPORIDIUM* AVEC LE KIT COMMERCIAL MERIFLUOR® *CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA*

1. OBJET

Ce mode opératoire décrit le marquage des oocystes de *Cryptosporidium* par une technique d'immunofluorescence directe avec l'anticorps commercial Merifluor® à partir de différentes matrices (matières fécales, contenu intestinale, environnement...) avec ou sans concentration préalable des oocystes.

2. MATERIELS ET CONSOMMABLES

- Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia* kit (Réf. 250050, Meridian Bioscience, Milan, Italie), qui contient les produits suivants :
 - **Réactif de test (*Detection Reagent*)** : anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium* and anti-*Giardia* marqués FITC en solution tamponnée contenant un agent de stabilisation des protéines et 0.1% d'azoture de sodium.
 - **Contre-colorant (*Counterstain*)** : solution de noir d'ériochrome.
 - **Tampon de lavage 20X** : Tampon de lavage concentré avec agent conservateur.
 - **Témoin positif** : Échantillon fécal formolé d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* contenant 0.09% de thiomersal.
 - **Témoin négatif** : Échantillon fécal formolé contenant 0.09% de thiomersal.
 - **Milieu de montage** : Glycerol tamponné contenant du formol, un antiqencher and 0.05% d'azoture de sodium.
 - **Öses**
 - **Lames traitées**
- Teflon printed diagnostic slide, noire de 10 puits 8 mm Num (Réf. 6110015, Immuno-Cell Int., Dominique Dutscher©) pour la réalisation de dénombrement d'échantillon dilué car trop concentré lors du 1^{er} marquage
- Phosphate Buffered Saline, PBS, (18912-014, Gibco by Life Technology©)
- Acétone
- Eau mQ
- Chambre humide
- Prolong antifade (Invitrogen©) ou milieu de montage avec un antifading si conservation des lames plusieurs jours
- Coverslides, lamelles couvre objet (24 x 67 mm), (Réf. 100043, Dominique Dutscher©)
- Microscope à fluorescence équipé d'un système de filtration pour l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

3. HYGIENE ET SECURITE

- Le port de gants est obligatoire dès l'étape d'infestation par *Cryptosporidium spp*
- Tous les surnageants de culture après ajout des oocystes doivent être **décontaminés** avec de l'eau bouillante. Ajouter assez d'eau dans le bécher pour que la température des liquides **soit >60°C**

4. PROCEDURE :

a. Préparation des lames

- Bien homogénéiser l'échantillon :

- Pour les matières fécales ou le contenu intestinal dilués dans du PBS => Vortexer les Falcon de 15 ml ou de 50 ml jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
- Pour les matières fécales non diluées => bien mélanger avec la öse bleue (Transfer Loops, Merifluor).
- Déposer 20 µL de la suspension fécale sur un puits de la lame de 10 puits (si quantification envisagée) ou sur la lame Merifluor (treated slide) si le but est de diagnostiquer la cryptosporidiose.
- Déposer 20 µL de chacun des témoins fournis dans le kit Merifluor (Témoin positif + Témoin négatif)
- Déposer 20 µL de Témoin positif *C. parvum*, souche Iowa (Waterborne)
 - Laisser sécher au moins 30 min (voire une heure ou plus) à température ambiante (sous sorbonne)

b. Fixation

Etape à réaliser sous sorbonne

- Déposer 20 µl/puits d'acétone
 - Laisser sécher (environ 15 min sous la sorbonne)

Remarque : possibilité d'arrêter la procédure à ce stade et de la reprendre au plus tard dans une semaine.
Mettre, dans ce cas, les lames dans un porte-lame et les conserver au sec à température ambiante.

c. Marquage

- Préparer la solution de marquage dans un tube opaque (couvert par du papier aluminium) :
 - *Detection Reagent* de Merifluor (l'anticorps) est dilué au 1/4 (vol/vol) dans du PBS + 1 goutte par lame de solution de contre coloration (*counterstain*),
 - Pour X échantillons avec 20µl /puits :
 - Volume de l'anticorps = X x 5µL
 - Volume de PBS= X x 15 µL
- Ajouter 20 µl de cette solution de marquage/puits,
 - Incuber 45 min en chambre humide à température ambiante à l'obscurité
- Préparer la solution de lavage
 - Diluer celle-ci au 1/20^{ème} dans de l'eau mQ soit 1ml de solution de lavage dans 19ml d'eau mQ
- Déposer délicatement à la pasteurette une goutte de solution de lavage au dessus du puits en penchant la lame pour que le goutte glisse vers le bas du puits.

d. Montage

- Aspirer le surplus de marquage délicatement avec du papier, et ne pas attendre que la lame sèche
- Monter rapide des lames avec des lamelles en mettant :
 - Une goutte de solution de montage (fourni ou pas), et du vernis sur les 4 côtés de la lame
 - Ou une goutte de solution Prolong antifade, reconstituée de la façon suivante :
 - Décongeler le tampon B entre ses doigts ou 5 secondes au micro-onde (selon le volume de tampon restant dans la bouteille)
 - Grâce au compte-goutte du flacon, ajouter 32 gouttes de tampon B dans le petit tube marron contenant le réactif A (poudre)
 - Homogénéiser délicatement le mélange (A+B) sans faire de bulle en utilisant une pasteurette
- Mettre les lames dans un porte lame à l'obscurité jusqu'à leur lecture (2 heures après montage)
- La lecture est réalisée sur des lignes verticales sur toute la lame avec le grossissement X 400.

Annexe 2 : protocole d'extraction d'ADN

EXTRACTION D'ADN D'OOCYSTES DE *CRYPTOSPORIDIUM SP.*

1. OBJET

- Ce mode opératoire décrit la méthode à suivre pour réaliser l'extraction d'ADN d'oocystes de *Cryptosporidium sp.*

2. MATERIELS ET CONSOMMABLES

- Bain-marie à sec et à eau
- Centrifugeuse pour microtubes de 1,5 mL et 2 mL
- Micropipettes
- Tube Eppendorf® de 1,5 mL et 2 mL
- Kit d'extraction QIAamp Mini Kit DNA (Référence 51306, QIAGEN®).
- Azote liquide
- Ethanol pur
- Oocystes de *Cryptosporidium parvum*, souche Iowa, solution contenant 5.10^6 oocystes dans 8ml, réf. P102C, waterborne

3. HYGIENE ET SECURITE

- Le port de gants est obligatoire.
- Lors de la manipulation de l'azote, il est obligatoire de porter tous les EPI (gants, tabliers, chausse et visière de protection) conçus pour résister à l'azote.

4. EXTRACTION

a. Pré-traitement par chocs thermiques

- Cette étape va permettre de rompre la paroi des oocystes :
 - Transférer **200 µL** de suspension d'oocystes à extraire dans un tube Eppendorf de 2 mL,
 - Percer les tubes au niveau du couvercle avec une aiguille pour éviter leur ouverture
 - Après s'être équipé des EPI adaptés, remplir un thermos avec de l'azote liquide.
 - Le ou les tubes(s) contenant les oocystes vont être soumis à 6 à 10 cycles de chocs thermiques selon la procédure suivante :
 - Le(s) tube(s) sont plongés dans l'azote jusqu'à congélation de la suspension
 - Le(s) tube(s) sont ensuite incubés dans un bain-marie à sec à 95°C jusqu'à décongélation
- Remarque : si l'extraction n'est pas faite le jour même, les tubes peuvent être mis à -20°C.

b. Extraction avec le kit QIAamp Mini Kit DNA

- Préparer sur un portoir pour chaque échantillon à traiter, 2 tubes collector (fournis), 1 tube/colonne et 1 Eppendorf de 1,5 mL (non fourni)
- Dans le tube contenant les oocystes, ajouter 20 µL de protéinase K et mélanger par aspiration/refoulement,
- Déposer ensuite 200 µL de Tampon AL et vortexer pendant 15 s,
 - Incuber pendant 10 mn à 56°C au bain-marie à eau,
 - Centrifuger à 14 000 rpm pendant 1 mn,

- Ajouter 200 μ L d'éthanol 100%, et vortexer pendant 15 s,
 - Centrifuger à 14000 rpm pendant 1 min (pour enlever les gouttelettes du couvercle),
- Dans une colonne/tube collector, déposer délicatement le lysat sans toucher les bords et fermer le couvercle
 - Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn,
- Placer la colonne dans un nouveau tube collector et jeter le tube contenant le filtrat
 - Si le lysat n'est pas complètement passé à travers la colonne après la centrifugation, centrifuger de nouveau jusqu'à ce que la colonne soit sèche.
 - Ouvrir délicatement la colonne et ajouter 500 μ L de tampon AW1.
 - Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn.
- Placer la colonne dans un nouveau tube collector et jeter le tube contenant le filtrat,
 - Ouvrir délicatement la colonne et ajouter 500 μ L de tampon AW2.
 - Centrifuger à 14000 rpm pendant 3 mn.
 - Vider le tube collector contenant le filtrat.
- Replacer la colonne sur ce tube, et centrifuger à 14000 rpm pendant 1mn et jeter le tube contenant le filtrat.
- Transférer la colonne dans un eppendorf de 1,5 mL (non fourni) et y déposer 200 μ L de Tampon AE.
 - Incuber 5 mn à température ambiante et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn pour éluer l'ADN.
- Conserver l'ADN ainsi obtenu à -20°C.

Annexe 3 : protocole de PCR 18S

AMPLIFICATION D'ADN DE LA SOUS UNITE 18S DE *CRYPTOSPORIDIUM SP.* PAR PCR NICHE

1. OBJET

Ce mode opératoire décrit la méthode à suivre pour réaliser une PCR nichée 18S permettant d'amplifier un fragment du gène SSU rRNA de *Cryptosporidium sp.* Cette méthode s'appuie sur les publications de Xiao et al. 1999 et 2001 ; Rieux. et al. 2013. Elle permet de détecter la présence d'ADN de *Cryptosporidium sp.*

2. MATERIELS ET CONSOMMABLES

- Thermocycleur, MasterCycler, Eppendorf©
- Cuve à électrophorèse et générateur
- Hotte avec UV, boîte à gants
- Micropipettes
- Microtubes de 0,2ml à 2ml
- Master Mix 2X, référence M7502, Promega© contenant
 - Taq DNA polymerase
 - Mix de dNTPs : dATP,dGTP,dCTP,dTTP
 - MgCl₂
- Eau DNA free
- Amorces, Eurofins© :
 - 1^{er} run :
 - F2 : 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'
 - R2 : 5'-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'
 - 2^{ème} run :
 - F3 : 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'
 - R3 : 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'
- Agarose
- TAE 1X
- BET
- Marqueur de taille pour ADN, 100pb
- Tampon de charge 6X

3. HYGIENE ET SECURITE

- Le port de gants est obligatoire.
- La préparation des mix et l'ajout de l'ADN ou des amplicons se réalisent dans 2 hottes différentes.
- Pour les manipulations en pièce Bet, suivre les consignes de sécurité en vigueur.

4. AMPLIFICATION PAR PCR NICHE

a. 1^{er} run

- Dans un portoir réfrigéré, préparer autant de microtubes de 0,2mL que d'échantillons à traiter + 2 témoins.
- Préparer le mix pour n+2 échantillons :
 - Pour un échantillon :
 - 25µL de Master Mix 2X,

- 16µL de Water
- 0,5µL de chaque amorce F2 et R2 à 10µM
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle,
- Distribuer 42µL de mix dans chaque microtube
- Déposer 8µl d'ADN dans les microtubes échantillon, 8µl d'ADN de *Cryptosporidium parvum* dans le témoin positif et 8µl d'eau dans le témoin négatif.
 - Centrifuger les microtubes ainsi préparés et les déposer dans le thermocycleur
 - Lancer le programme :
 - Heat lid : 112°C
 - Dénaturation : 94°C, 10 min
 - Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 94°C, 45 s
 - Hybridation : 55°C, 45 s
 - Elongation : 72°C, 1 min
 - Elongation finale : 72°C, 5 min

b. 2ème run

- Dans un portoir réfrigéré, préparer autant de microtubes de 0,2mL que de tube du 1^{er} run + 1 témoin négatif.
- Préparer le mix pour n+1 tube :
 - Pour un tube :
 - 25µL de Master Mix 2X,
 - 19µL de Water
 - 0,5µL de chaque amorce F3 et R3 à 10µM
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle,
- Distribuer le mélange ainsi préparé à raison de 45µL dans chaque microtube.
- Déposer 5µl d'amplicon dans les microtubes échantillon et 5µl d'eau dans le témoin négatif.
 - Centrifuger les microtubes ainsi préparés et les déposer dans le thermocycleur
 - Lancer le programme :
 - Heat lid : 112°C
 - Dénaturation : 94°C, 10 min
 - Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 94°C, 45 s
 - Hybridation : 55°C, 45 s
 - Élongation : 72°C, 1 min
 - Élongation finale : 72°C, 5 min

5. MIGRATION

- Préparer un gel d'agarose 2 % en tampon TAE 1 X contenant 2 gouttes de BEt pour 100ml de gel.
- Mélanger une goutte (environ 1,6µl) de tampon de charge 6X avec 8.4µl de produits d'amplification sur un morceau de parafilm.
- Déposer ce mélange (10µl) dans un puits du gel.
- Déposer 8 µL de Ladder 100pb
- 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 un marqueur de taille moléculaire DNA Ladder de 100 pb.

- **Remarque :**

Il est possible d'identifier l'espèce présente dans la matrice étudiée en associant un **séquençage** à la PCR 18S ou en associant une RFLP.

Annexe 4 : protocole de RFLP

IDENTIFICATION DE L'ESPECE DE *CRYPTOSPORIDIUM SP.* PAR RFLP

5. OBJET

Ce mode opératoire décrit la méthode à suivre pour identifier les espèces de *Cryptosporidium sp.* par digestions enzymatiques de produits de PCR amplifiés en 18S.

6. MATERIELS ET CONSOMMABLES

- Lecteur de gel
- Hotte chimique
- Bain Marie (37°C)
- Cuve à électrophorèse
- Portoir réfrigéré
- Micropipettes
- Tubes eppendorf à 1,5ml
- Enzymes de restriction: **Sspl** (R0132S), **MbolI** (R0148S) (New England BioLabs, France).
- BUFFER « tampon »
- Eau milliQ stérile
- ADN amplifié par PCR 18S
- TAE 1X
- Marqueur de taille pour ADN, 100pb
- Tampon de charge 6X
- Agarose (MetaPhor Agarose 125 g, Réf. LON 50180, Ozyme©)
- Bromure d'éthidium (BEt)

7. HYGIENE ET SECURITE

- Le port de gants est obligatoire.
- La préparation des mix et l'ajout de l'ADN ou des amplicons se réalisent dans 2 hottes différentes.
- Suivre les consignes d'hygiène et sécurité de la pièce Bet

8. DIGESTION ENZYMATIQUE

a. Préparation des échantillons

- Dans un portoir réfrigéré, préparer autant de microtubes de 1,5mL que d'échantillons à traiter + 2 témoins.
- Préparer le mix pour n+1 échantillons et pour chaque enzyme testée :
 - o Pour un échantillon :
 - 7.6µL d'eau milliQ stérile
 - 2µL de de buffer (tampon de l'enzyme de restriction testée)
 - 0,4µL d'enzyme de restriction testée
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle,
- Distribuer 10µL de mix dans chaque microtube
- Déposer 10 µl de chaque produit d'ADN amplifié par PCR 18S, 10µl d'ADN amplifié par PCR 18S de *Cryptosporidium parvum* dans le témoin positif et 10µl d'eau milliQ stérile dans le témoin négatif.
 - o Centrifuger les microtubes ainsi préparés

b. Digestion enzymatique

- Déposer les tubes préparés dans le bain marie à sec à 37°C
 - o Incuber selon les temps de digestion suivant :

Enzyme de restriction	Temps d'action (heure)
Sspl	2
MbolI	1

9. MIGRATION

- **La veille :**
 - Préparer un Erlenmeyer contenant 2 % de Methaphor agarose dans du TAE 1X
 - Mettre à +4°C
- Le jour même :
 - Réaliser le gel avec la préparation de la veille et en rajoutant 2 gouttes de Bet pour 100ml de gel.
 - Laisser polymériser au moins 1h
- Déposer 4µl de tampon de charge 6X dans chaque tube contenant l'ADN digéré.
- Déposer ce mélange (20µl) dans un puits du gel.
- Déposer 8 µL de Ladder 100pb
- Migrer 1h à 70V puis 2h à 100V
- Visualiser l'ADN sous UV, à l'aide du lecteur du gel
 - o La taille des fragments obtenus est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire DNA Ladder de 100 pb.
 - o Identification d'espèce est réalisé par l'analyse des profils obtenus

Annexe 5 : protocole de PCR GP60

AMPLIFICATION D'ADN CODANT POUR LA GLYCOPROTEINE GP60 DE CRYPTOSPORIDIUM *PARVUM* PAR PCR NICHE

1. OBJET

Ce mode opératoire décrit la méthode à suivre pour réaliser une PCR nichée gp 60 permettant d'amplifier l'ADN codant pour la glycoprotéine gp 60 de *Cryptosporidium* sp. Cette méthode s'appuie sur les publications de Follet et al, 2011. Alves et al, 2003. et Gatei et al, 2006. Elle permet de détecter après génotypage de déterminer le sous-type de *Cryptosporidium parvum*.

2. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Follet et al.: *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Veterinary Research* 2011 42:116
- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2744–7
- Gatei W, Hart CA, Gilman RH, Das P, Cama V, Xiao L: Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *J Eukaryot Microbiol* 2006, 53(Suppl 1):S43-S48

3. MATERIELS ET CONSOMMABLES

- Thermocycleur, Master cycler, Eppendorf
- Cuve à électrophorèse et générateur
- Hotte avec UV, boîte à gants
- Micropipettes
- Microtubes de 0,2ml à 2ml
- Phusion hot start II 500U, référence 10628439, Thermofisher© contenant
 - Phusion Hot Start DNA Polymerase
 - Eau DNA free
 - MgCl₂
 - 5X Phusion HF Buffer
- Eau DNA free
- Amorces, Eurofins :
 - 1^{er} run :
 - GP60F1A 5'-ATAGTCTCCGCTGTATTA-3'
 - GP60F1 5'- ATAGTCTCCGCTGTATTTC-3'
 - GP60R1 5'- GGAAGGAACGATGTATCT-3'
 - 2^{ème} run :
 - GP60F2A 5'-TCCGCTGTATTATCAGCC-3'
 - GP60F2 5'- TCCGCTGTATTCTCAGCC-3'
 - GP60R2 5'- GCAGAGGAACCAGCATC-3'
- Mix de dNTPs, 10mM (dATP,dGTP,dCTP,dTTP) référence 10319879, Thermofisher©
- Agarose
- TAE 1X
- BEt
- Marqueur de taille pour ADN, 100pb
- Tampon de charge 6X

4. HYGIENE ET SECURITE

- Le port de gants est obligatoire.
- La préparation des mix et l'ajout de l'ADN ou des amplicons se réalisent dans 2 hottes différentes.
- Pour les manipulations en pièce Bet, suivre les consignes de sécurité en vigueur.

5. AMPLIFICATION PAR PCR NICHE

a. 1^{er} run

- Dans un portoir réfrigéré, préparer autant de microtubes de 0,2mL 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 2.5mM
 - 1,25µL de chaque amorce F1 et F1A à 10µM
 - 2,5µL de l'amorce R1 à 10µM
 - 0,5µL de Taq polymerase à 2U/µl
 - 20,5µL de Water
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle,
- Distribuer 40µL de mix dans chaque microtube
- Déposer 10µl d'ADN dans les microtubes échantillon, 10µl d'ADN de *Cryptosporidium parvum* dans le témoin positif et 10µl d'eau dans le témoin négatif.
 - Centrifuger les microtubes ainsi préparés et les déposer dans le thermocycleur
 - Lancer le programme :
 - Heat lid : 112°C
 - Dénaturation : 98°C, 30 s
 - Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 5 s
 - Hybridation : 60°C, 10 s
 - Élongation : 72°C, 15 s
 - Élongation finale : 72°C, 1 min

b. 2^{ème} run

- Dans un portoir réfrigéré, préparer autant de microtubes de 0,2mL 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 2.5mM
 - 1,25µL de chaque amorce F2 et F2A à 10µM
 - 2,5µL de l'amorce R2 à 10µM
 - 0,5µL de Taq polymerase à 2U/µl
 - 28,5µL de Water
- Vortexer le mélange et centrifuger pour enlever les gouttelettes sur le couvercle,
- Distribuer le mélange ainsi préparé à raison de 48µL dans chaque microtube.
- Déposer 2µl d'amplicon dans les microtubes échantillon et 2µl d'eau dans le témoin négatif.
 - Centrifuger les microtubes ainsi préparés et les déposer dans le thermocycleur
 - Lancer le programme :
 - Heat lid : 112°C

- Dénaturation : 98°C, 30 s
 - Puis 40 cycles :
 - Dénaturation : 98°C, 5 s
 - Hybridation : 60°C, 10 s
 - Élongation : 72°C, 15 s
- Élongation finale : 72°C, 1 min

6. MIGRATION

- Préparer un gel d'agarose 2 % en tampon TAE 1 X contenant 2 gouttes de Bet pour 100ml de gel.
- Mélanger une goutte (environ 1,6µl) de tampon de charge 6X avec 8.4µl de produits d'amplification sur un morceau de parafilm.
- Déposer ce mélange (10µl) dans un puits du gel.
- Déposer 8 µL de Ladder 100pb
- 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 un marqueur de taille moléculaire DNA Ladder de 100 pb.

- **Remarque :**

L'identification du sous type de *Cryptosporidium parvum* est associé à un **séquençage** des produits de PCR obtenus par la société Genoscreen.



Annexe 6 : protocole d'IMS

Equipement et Matériel

- Tubes Leighton 10 (L-10)
- Magnets (MPC™-1 ou MPC™-6)
- Mixeur rotatif
- Vortex
- Micropipettes
- Cônes
- Gants

Réactifs

- Eau MilliQ
- HCl 1N:
 - 122µl d'HCl à 25% qsp 10ml eau distillée
- Sodium hydroxide (NaOH) à 1 N :
 - 0.4g de NaOH qsp 10ml eau distillée
- Hypochlorite de sodium

1. L'échantillon doit être mis en suspension dans un volume final de 10 ml d'eau,
2. Laisser l'échantillon s'équilibrer à température ambiante,
3. Diluer 1 ml de tampon 10X SL™ A avec 9 ml d'eau déminéralisée. Conserver cette solution pour une utilisation ultérieure,
4. Dans un tube L-10 à côté plat, ajouter 1 ml de tampon 10X SL™ A et 1 ml de tampon 10X SL™ B,
5. Transférer immédiatement l'échantillon dans le tube L-10 contenant les tampons SL™. Étiqueter le tube avec un exemple de code d'identification,
6. Vortexer le flacon anti-Cryptosporidium Dynabeads™ ou anti-Giardia Dynabeads™ pendant 10 s,
7. Suspendre complètement les billes en inversant le flacon. Ajouter 100 µL d'anti-Cryptosporidium Dynabeads™ ou d'anti-Giardia Dynabeads™ au tube L-10,
8. Fixer le tube L-10 à un mélangeur rotatif (par exemple MX1) et tourner à 15-20 rpm pendant 1 heure à température ambiante,
9. Placer le tube L-10 dans le MPC™ -1 ou MPC™ -6 avec le côté plat du tube orienté vers l'aimant,

10. Sans retirer le tube de l'aimant, placer le côté aimant du MPC TM -1 vers le bas (le tube est horizontal et au-dessus de l'aimant),
11. Secouer doucement le tube bout à bout, d'environ 90 °, en inclinant tour à tour l'extrémité du capuchon et l'extrémité de la base du tube. Incliner pendant 2 min avec environ une inclinaison par seconde,
12. Remettre l'aimant en position verticale, tube vertical, avec le capuchon en haut. Retirer le capuchon et verser tout le surnageant,
13. Retirer le tube de l'aimant et suspendre l'échantillon dans 1 ml de tampon 1X SL TM A. Mélanger doucement pour suspendre tout le matériel dans le tube,
14. Transférer tout le liquide et les billes du tube L-10 dans un tube de 1,5 ml étiqueté,
15. Placer le tube de 1,5 ml dans le MPC TM -S, avec la bande magnétique placée en position verticale,
16. Sans retirer le tube de 1,5 ml du MPC TM -S, incliner doucement le MPC TM -S d'avant en arrière de 90 °. Continuer pendant 1 min avec une inclinaison d'environ 90 ° par seconde,
17. Aspirer immédiatement le surnageant du tube et du capuchon contenus dans le MPC TM -S. Si plusieurs échantillons sont en cours de traitement, effectuer trois mouvements de va-et-vient à 90 ° avant de retirer le surnageant de chaque tube,
18. Retirer la bande magnétique du MPC TM -S,
19. Ajouter 50 µL de HCl 0,1 N dans le tube de 1,5 ml et vortexer pendant 10 secondes,
20. Placer le tube dans le MPC TM -S sans bande magnétique en place et laisser reposer en position verticale pendant au moins 10 minutes à température ambiante,
21. Vortexer pendant 10 s,
22. Assurez-vous que l'échantillon se trouve à la base du tube. Placer le tube de 1,5 ml dans le MPC TM -S,
23. Insérer la bande magnétique dans le MPC TM -S en position inclinée et laisser le tube reposer pendant environ 10 secondes,
24. Transférer tout le liquide dans un tube de 1,5 ml propre contenant 5 µL de NaOH 1 N. Mélanger immédiatement,
25. Régler le volume à 1 ml avec de l'eau milliQ,
26. Ajouter un volume égal de 0,6% de chlore actif (sous forme d'hypochlorite de sodium) soit 1 goutte de javel à 1%,
27. Laver trois fois avec de l'eau exempte de nucléase. Centrifuger à 1 100 g pendant 5 min, en utilisant un rotor oscillant et un profil d'accélération-décélération doux pour minimiser les dommages aux kystes,

28. Suspendre le culot dans 215 μL d'eau exempte de nucléase. Utiliser 15 μL pour l'IFA et 200 μL pour l'extraction d'ADN.



Annexe 7 : protocole d'extraction d'ARN et de RT-PCR

1. OBJET

Ce mode opératoire décrit comment détecter *Cryptosporidium* dans des oocystes de *Cryptosporidium* par utilisation d'une RT-PCR

2. REACTIFS

- Oocystes de *C. parvum* isolat Iowa : 3-4.10⁶oocystes
- RNA protect cell reagent, réf 76526, Qiagen©
- RNeasy Mini kit, réf 74134, Qiagen©
- Amorces, Eurofins© :
 - Pour CPVL : For-5'-AAGTTTGTCAATATCTATGAGATAC-3' et Rev-5'-TCCATAAATTTTGTGACTCCTG-3' CPVS_ORF_F and CPVS_ORF_R
 - Pour CPVS: For- 5'-ATTACAAGTTTTGAATCAATAGAG-3' et Rev-5'-ATGGGAGCGATCTGCGCTACAC-3'
 - Pour CP: For- 5'-TGGTTCCGATTTTACCGGAA-3' et Rev- 5'-ACGACAATTAGGACTCAAATGACC-3'
 - Pour RdRp : For- 5'-TGGGCATATGGTGCTACTA-3' et Rev- 5'-GCTAAGAGATCGTAGATGTCCA-3'
- Rétrotranscription en utilisant le kit Maxima H minus Reverse transcriptase de Thermo, ref EPO 0752
- Kit DNaseI de chez Invitrogen© ref 18068-015
- dNTP
- Seringue + aiguille G20 (diamètre 0,9mm)
- Hot start phusion polymerase High fidelity, Thermofisher©, ref F549

3. Mode Opératoire

3.1. Extraction d'ARN

- 200µl oocystes sont déposés dans un Eppendorf de 1,5ml
- Les tubes sont centrifugés 5 min à 8 000g
 - 140µl de surnageant est enlevé à la pipette
 - Ajout de 140µl de RNA later
- 10 cycles de congélation/décongélation ; 350µL de buffer RLT Plus sont ajouter au 3ème cycle de congélation/ décongélation
- 18µl de protéinase K à 18mg/ml est ajoutée dans les tubes
 - Incubation 1 h à 55°C au Bain marie à eau
 - Homogénéiser la préparation en utilisant une seringue munie d'une aiguille G20 (diamètre 0,9mm)
- Transférer le lysat sur une colonne gDNA Eliminator déposée sur un tube collector :
 - Fermer doucement le bouchon
 - Centrifuger 30 s à une vitesse de mini de 8000g (> 10 000 rpm)
 - Jeter la colonne et garder le liquide contenu dans le tube collector

- Ajouter 350 μ L d'éthanol 70% (1 volume) puis mélanger par pipetage (ne pas centrifuger)
- Transférer la suspension obtenue dans une colonne RNAeasy spin placée sur un tube collector
 - Remarque : déposer au max 700 μ L sur la colonne. Si vol supérieur faire cette étape en plusieurs fois.
 - Fermer doucement le bouchon
 - Centrifuger 15 s à une vitesse de mini de 8000g
 - Jeter le liquide contenu dans le tube collector et redéposer la colonne dessus
- Ajouter 700 μ l de RW1 buffer
 - Fermer doucement le bouchon
 - Centrifuger 15 s à une vitesse de mini de 8000g
 - Jeter le liquide contenu dans le tube collector et redéposer la colonne dessus
- Ajouter 500 μ l de RPE buffer
 - Fermer doucement le bouchon
 - Centrifuger 15 s à une vitesse de mini de 8000g
 - Jeter le liquide contenu dans le tube collector et redéposer la colonne dessus
- Ajouter 500 μ l de RPE buffer
 - Fermer doucement le bouchon
 - Centrifuger 2 min à une vitesse de mini de 8000g
 - Jeter le liquide contenu dans le tube collector et redéposer la colonne dessus
 - Centrifuger 1 min à une vitesse de mini de 8000g
 - Jeter le liquide contenu dans le tube collector et redéposer la colonne dessus
- Placer la colonne sur un Eppendorf de 1,5ml et ajouter 40 μ l d'eau RNAse free
 - Centrifuger 1 min à une vitesse de mini de 8000g

3.2. Mesurer la concentration de l'ARN et sa qualité au Nanodrop à 260 nm

3.3. Traitement à la DNase

- Pour chaque tube d'ARN élué précédemment, ajouter la DNase et le buffer selon les volumes suivant :

produits	Vol pour 1 μ g d'ARN (10 μ l d'ARN)	Volume par échantillon (40 μ l d'ARN)
DNase	1 μ l	4 μ l
DNase buffer	1 μ l	4 μ L

- Incubation 15 min à RT
- Ajout de 1 μ l d'EDTA 25 mM dans chaque tube et incubation 10 min à 65°C

3.4. RétroTranscription en utilisant le kit Maxima H minus Reverse transcriptase de Thermo, ref EPO 0752

- préparation du mix 1 suivant dans la glace :

produits	Vol pour chaque tube
Oligo(dT)	3µl
dNTP 10mM	3µl
Eau nucléase free	Qsp 43,5µL soit 24µl

- Préparer le mix pour le nombre d'échantillon puis distribuer 30µl de mix par tube
- Ajouter 13,5µl d'ARN
- Préparer le mix 2 :

produits	Vol pour 1 tube
5X RT Buffer	12 µl
RNase Inhibitor	1.5µl
Maximus RT	3µl
eau	Qsp 60µL soit 0µl

- Déposer 16.5µl de mix dans chaque tube contenant l'ARN + mix1
- Mélanger puis centrifuger brièvement
- Incuber 30 min à 50°C
- Chauffer 5 min à 85°C

3.5. Réalisation des PCRs :

- Préparer le mix
 - PCR CP

produits	Volume pour 1 tube Vf = 50 µl	Cf
5X Phusion HF Buffer	10 µl	1X
dNTPs à 10 mM	1 µl	200mM chaque
Primers à 10µM	2.5µl de CP –AP-few 2.5µl de CP –AP Rev 1µl de de CP-CP-few 1µl de de CP-CP-Rev	0,5µM
Phusion HS	0,5 µl	0,02U/µl
Eau nuclease free	Qsp 48 µL soit 26.5 µl	/

- Ajouter 2µl de cDNA
 - PCR CP/ RdRp

produits	Volume pour 1 tube Vf = 50 µl	Cf
5X Phusion HF Buffer	10 µl	1X
dNTPs 10 mM	1 µl	200mM chaque
Primers à 10µM	2.5µl de RdRp –AP-few 2.5µl de RdRp –AP Rev 1µl de de RdRp -CP-few 1µl de de RdRp -CP-Rev	0,5µM
Phusion HS	0,5 µl	0,02U/µl
Eau nuclease free	Qsp 48 µL soit 26.5 µl	/

- Ajouter 2µl de cDNA

- Lancer le run suivant pour ces 2 PCRs (cycle nommé CP-RdRp) ;

Name	Température	Hold
Pré-incubation	98°C	3 min
Amplification X35	98°C	10 s
	51°C	30 s
	72°C	1min
Elongation finale	72°C	5min

- Faire migrer 9µl de produit PCR mélanger 2µl de tampon de charge 6X sur gel d'agarose 2 % TAE 1X, 120V pendant 40min.

- PCR CPVL

produits	Volume pour 1 tube Vf = 50 µl	Cf
5X Phusion HF Buffer	10 µl	1X
dNTPs 10 mM	1 µl	200mM chaque
Primers à 10µM	2.5µl de CPVL fw 2.5µl de CPVL rev	0,5µM
Phusion HS	0,5 µl	0,02U/µl
Eau nuclease free	Qsp 48 µL soit 31.5 µl	/

- Ajouter 2µl de cDNA

- PCR CPVS

produits	Volume pour 1 tube Vf = 50 µl	Cf
5X Phusion HF Buffer	10 µl	1X
dNTPs 10 mM	1 µl	200mM chaque
Primers à 10µM	2.5µl de CPVS fw 2.5µl de CPVS rev	0,5µM
Phusion HS	0,5 µl	0,02U/µl
Eau nuclease free	Qsp 48 µL soit 31.5 µl	/

- Ajouter 2µl de cDNA
- Lancer le run suivant pour ces 2 PCRs (cycle ORF)

Name	Température	Hold
Pré-incubation	98°C	3 min
Amplification X35	98°C	10 s
	Gradient de température entre 52°C	30 s
	72°C	1min
Elongation finale	72°C	5min

- Faire migrer 9µl de produit PCR mélanger 2µl de tampon de charge 6X sur gel d'agarose 2 % TAE 1X, 120V pendant 40min.

3.6. Résultats :

- Présence d'une bande pour toutes les PCRs à la taille attendue :

CP à 351 pb
RdRp à 200 pb
CPVL à 1576 pb
CPVS à 954 pb



Annexe 8 : protocole de qPCR

1. OBJET

Ce mode opératoire décrit comment détecter Cryptosporidium dans des oocystes de Cryptosporidium par utilisation d'une RT-qPCR

2. REACTIFS

- Oocystes de C. parvum isolat Iowa : 3-4.10⁶oocystes
- RNA protect cell reagent, réf 76526, Qiagen©
- RNeasy Mini kit, réf 74134, Qiagen©
- ONEGreen Fast qPCR Premix, ref OZYA008-40
- Maxima H minus Reverse transcriptase de Thermofisher©, ref EPO 0752
- Amorces, Eurofins©:
 - VirSymFor- 5'-TGGTTCCGATTTTACCGGAA-3'
 - VirSymbRev- 5'-ACGACAATTAGGACTCAAATGACC-3'
 - GAPDH_F-5'-CCTGCACCACCACTGCTTA-3'
 - GAPDH_R-5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGAG-3'
- kit DNaseI de chez Invitrogen© ref 18068-015
- dNTP, 10mM
- Seringue + aiguille G20 (diamètre 0,9mm)

3. Mode Opérateur

Préparer le mix

3.1.1. qPCR avec le kit ONEGreen© Fast qPCR Premix, ref OZYA008-40

Produit	Vol pour 1 tube	
2X One green FastqPCR	10µl	10µl
Primers	0,4µl de sym for et rev à 10µM (Cf 2.5µM)	1,8µl de F et R GAPDH à10µM
Eau nuclease free	Qsp 25µl soit 7,7 µl	Qsp 25µl soit 4,9µl
cDNA	1,5µl	1,5µl

3.1.2. - Programme :

Name (cycle / analysis Mode)	Température	Acquisition	Hold	Ramp rate
Activation (1 cycle/none)	95°C	None	10 min	4,4
Amplification (45 cycles / quantification)	95°C	None	15 s	1,5
	60°C	single	1 min	1,5
Melting curve (1 cycle/melting curve)	60°C	None	15 s	4,4
	95°C°	Continuous	/	0,03 Acquisition 20/°C

Annexe 9 : tableaux des résultats des manipulations

n° interne	N°	C. parvum	C. hominis	génotype	Commentaire	département
1	30825835	26,63		IlaA17G2R1	épidémie	10110
2	30835030	27,21		IlaA17G2R1	épidémie	10110
3	30825833	24,29		IlaA17G2R1	épidémie	10110
4	30825840	29,26		IlaA17G2R1	épidémie	10110
5	30825830	26,84		IlaA17G2R1	épidémie	10110
6	30825832	21,23		IlaA17G2R1	épidémie	10110
7	30825853	23,9		IlaA17G2R1	épidémie	10110
8	30835023	31,44		IlaA17G2R1	épidémie	10110
9	30835035	22,67		IlaA17G2R1	épidémie	10110
10	30835075	31,61		IlaA17G2R1	épidémie	10110
11	31435979	27,55		IlaA15G2R1		59820
12	31435969	36,58		IlaA11G2R1		62239
13	31435990	24,65		IldA18G1		62320
14	31435995	negatif		negatif	faux positif en BD max	62239
15	31435966	35,82		IlaA22G1R1		62440
16	31435996	28,23		IlaA13G2R1		62239
17	30345313		24,95	IbA10G2	Fecal swab	region parisienne
18	30345316	27,52		IlaA17G2R1	Fecal swab	region parisienne
19	30345282	ND		C. chipmunk	Fecal swab	region parisienne
20	30345252	35,46		IldA24G1	Fecal swab	region parisienne
21	30345263	37,37		IlaA15G2R1	Fecal swab	region parisienne
22	30345324		26,6	IdA16	Fecal swab	region parisienne
23	30345314			IlaA15G2R1	Fecal swab	region parisienne
24	30345304	37,98		IlaA16G1R1	Fecal swab	region parisienne
25	30345279		33,6	IeA11G3T3	Fecal swab	region parisienne
26	30345255	33,03		IlaA15G2R1	Fecal swab	region parisienne
27	30445875			IlaA16G2R1	faible concentration (non détectable en qPCR)	27350

28	30855486	28,87		non typable		76590
29	30445879	26,95		IlaA15G2R1		57
30	30535657	29,31		IlaA15G2R1		49
31	30425908	Meleagridis		IIIgA25G5R1		57
32	31435988	ND		IIdA20G1		62880
33	31435989	24,37		IIdA18G1		62320
34	31435971		31,76	IdA16		59229
35	31435968	26,18		IlaA15G2R1		59221
36	31435978	34,64		IIdA13G1		57
37	31435970		30,18	IdA16		59229
38	31435986	29		IIdA20G1		62880
39	31435981	32,5		IlaA15G2R1		59640
40	31435992	24,83		IlaA15G2R1		59600

n° interne	Crypovirus après IEMS					
	CP	RdRp	CPVL	CPVS	IF	qPCR CT
1	neg	neg	neg	neg	faible	33,96
2	pos	pos	pos	pos		25,88
3	pos	pos	pos	pos		24,28
4	faible	neg	neg	neg	pos	>40
5	neg	neg	neg	neg	faible	>40
6	pos	pos	pos	pos		23,73
7	pos	pos	pos	pos		29,42
8	pos	pos	pos	neg		31,79
9	pos	pos	pos	pos		28,31
10	pos	neg	neg	neg		33,91
11	pos	pos	pos	pos		34,65
12	pos	neg	neg	faible		38,25
13	neg	neg	neg	neg	pos	>40
14	faible	faible	pos	faible		31,41
15	neg	neg	neg	neg	faible	>40
16	pos	faible	pos	pos		33,99
17	neg	neg	neg	neg	pos	37,03
18	faible	neg	neg	neg		37,89
19	neg	neg	neg	neg	faible	37,27
20	neg	neg	neg	faible	faible	37,25
21	neg	neg	neg	neg	neg	35,6
22	neg	neg	neg	neg	pos	>40
23	neg	neg	neg	neg	pos	>40
24	faible	faible	neg	faible		31,77
25	neg	neg	neg	neg	neg	35,64
26	neg	neg	neg	neg	pos	>40
27	faible	neg	neg	neg		34,94
28	pos	pos	pos	faible		29,4
29	faible	faible	faible	neg		31,9

30	neg	neg	neg	neg		38,29
31	neg	neg	neg	neg	pos dégradé	36,79
32	neg	neg	neg	neg	neg	>40
33	neg	neg	neg	neg	pos dégradé	34,59
34	neg	neg	neg	neg	pos dégradé	35,55
35	pos	pos	pos	pos		27,22
36	faible	neg	neg	neg		33,04
37	neg	neg	neg	neg	neg	35,3
38	neg	neg	neg	neg	pos dégradé	35,45
39	neg	neg	neg	neg		>40
40	faible	faible	pos	faible	pos dégradé	35,18

Cryspovirus avant IEMS

n° interne	CP	RdRp	CPVL	CPVS	IF	séquençage
1			pos	faible	neg	pos
2						pos
3						pos
4	pos		pos	pos	neg	pos_CP
5			pos	pos	faible	pos
6						pos
7						pos
8						non exploitable
9						pos
10			?	pos		pos
11						pos
12					neg	pos_CP
13			neg	neg	faible	
14						pos
15			neg	?	neg	
16						pos
17			neg	neg	pos	
18			pos	pos		pos
19			neg	neg	neg	
20			faible	neg	neg	non exploitable
21			faible	faible	pos dégradé	pos
22			neg	neg		
23			neg	neg		
24			faible	faible		pos_CP
25			neg	neg	pos	
26			pos	pos		pos
27			pos	faible		pos
28						pos
29			pos	pos		pos
30			pos	pos		pos
31			pos	?		pos_partitiviridae
32			pos	pos	pos	pos

33			neg	neg		
34			neg	neg		
35						pos
36			pos	pos		pos
37			neg	neg	pos	
38			pos	pos		pos
39			pos	pos	pos	pos
40						pos

Résultats biologie moléculaire						
Ech Ovin	IF	Extraction ADN	PCR 18 S (genre Cryptosporidium)	PCR RFLP (Espèce)	GP60 (si C. parvum): amplification	séquençage GP60 (sous- type)
O80	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA15G2R1
O81	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA15G2R1
O82	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA15G2R1
O83	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA15G2R1
O84	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA15G2R1
O85	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA15G2R1
O86	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA15G2R1
O87	pos	oui	pos	parvum	pos	IlaA19G2R1
O88	neg	oui	faiblement pos	NC	neg	
O89	neg	oui	neg		pos	
O90	neg	oui	neg		neg	
O91	neg	oui	neg		neg	
O92	neg	oui	neg		neg	
O93	neg	oui	neg		neg	
O94	neg	oui	neg		neg	
O95	neg	oui	neg		neg	

Résultats cryspovirus				
Ech Ovin	CP	RdRp	VL	VS
O80	pos	pos	pos	pos
O81	pos	faiblement pos	pos	pos
O82	pos	pos	pos	pos
O83	pos	pos	pos	pos
O84	pos	pos	pos	pos
O85	faiblement pos	faiblement pos	faiblement pos	faiblement pos
O86	pos	pos	pos	pos
O87	pos	pos	pos	pos
O88	neg	neg	neg	neg

O89				
O90				
O91				
O92				
O93				
O94				
O95				

Ech Bovins	IF	Résultat biologie moléculaire					Résultats cryspovirus			
		Extraction ADN	PCR 18S (genre Cryptosporidium)	PCR RFLP (Espèce)	GP60 (si C. parvum): amplification	séquençage GP60 (sous-type)	CP	RdRp	VL	VS
B68	pos	oui	neg	<i>parvum</i>	pos	IlaA15 G2R1	pos	pos	pos	pos
B69	pos	oui	pos	<i>parvum</i>	pos	IlaA15 G2R1	neg	neg	neg	neg

ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DU CRYSPOVIRUS (CSPV-1) DANS LES ESPECES DE *CRYPTOSPORIDIUM* QUI CIRCULENT CHEZ L'HOMME ET LES RUMINANTS EN FRANCE

AUTEUR : Etienne CARVIN

RÉSUMÉ :

Les cryptosporidioses sont des maladies parasitaires zoonotiques d'importance majeure en santé humaine comme en santé animale. Elles sont à l'origine de pertes économiques majeures en élevage.

La découverte d'un symbionte viral chez *Cryptosporidium*, nommé *Cryspovirus*, a rebattu les cartes de la compréhension de la pathogénie et de l'épidémiologie de ce parasite. L'objet de ce travail était, après une étude bibliographique retraçant les principales caractéristiques de *C. parvum* et de *Cryspovirus*, de mettre en évidence la présence de CSPV-1 dans des échantillons de matières fécales recueillis sur le terrain ainsi qu'une analyse épidémiologique des clades de *Cryspovirus* circulant chez l'homme et les ruminants en France.

Ce travail a conduit à la réalisation de plusieurs PCR sur des échantillons collectés sur le terrain dans des élevages ovins et bovins ainsi que sur des échantillons d'origine humaine fournis par le Centre national de référence des cryptosporidies du CHU de Rouen. L'objectif était dans un premier temps de confirmer la présence d'une cryptosporidie dans l'échantillon puis de tester la présence des ARN viraux et enfin de les séquencer.

Nous avons montré que le *Cryspovirus* est très répandu parmi les lignées de cryptosporidies en France, et ce dans plusieurs espèces (humain, ovine, bovine). Il s'agit de la première description du *Cryspovirus* en France dans des lignées de *Cryptosporidium* isolées chez l'être humain.

Ce *Cryspovirus* est un virus à ARN qui présente un mode de transmission tout à fait original, par voie verticale exclusivement. La présence de ce virus dans les cryptosporidies semble être à l'origine d'une fécondité et d'une infectiosité majorée, sans que le mode d'action précis ne soit pour l'instant clairement identifié. L'hypothèse la plus probable est une action du virus sur la voie de l'interféron gamma chez l'hôte mammifère qui permet au parasite d'échapper au système immunitaire.

La prévalence observée de CSPV-1 au cours des manipulations était de près de 85% toutes espèces confondues. De nouvelles expériences doivent maintenant être entreprises sur cultures cellulaires afin de quantifier précisément l'effet de l'infection de *Cryptosporidium* par *Cryspovirus*.

MOTS CLÉS : CRYPTOSPORIDIOSE, CRYPTOSPORIDIUM, CRYSPOVIRUS, PARASITOSE, ÉPIDÉMIOLOGIE, ENDOSYMBIOSE, VIRUS

JURY :

Présidente : Pr Sophie LE PODER

Directeur de thèse : Pr Karim ADJOU

Examineur : Dr Bruno POLACK

Invitée : Dr Nolwenn DHEILLY

EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR STUDY ON CRYSPOVIRUS (CSPV-1) IN *CRYPTOSPORIDIUM* SPECIES CIRCULATING IN MAN AND RUMINANTS IN FRANCE

AUTHOR: Etienne CARVIN

SUMMARY:

Cryptosporidioses are parasitic zoonotic diseases that are crucially important in human health as in animal health. They lead to major economic loss in livestock farming.

The discovery of a viral symbiont in *Cryptosporidium* changed the understanding of the parasite's pathogeny and epidemiology completely. Such virus was named *Cryspovirus*. The purpose of this paper was, after a bibliographic review on the main features of *Cryptosporidium* and *Cryspovirus*, to search CSpV-1 in fecal samples collected in the field and to suggest an epidemiological analysis of the clades of *Cryspovirus* circulating in man and ruminants in France.

The experimental work accounted of in this paper led to the execution of multiple PCRs on samples collected in the field in sheep and cow farms and on human samples. The aim was at first to confirm the presence of *Cryptosporidium*, then to look for viral RNA, and finally to sequence it.

It was shown by the experimental work that *Cryspovirus* is widespread in France among numerous species (human, sheep, cattle). This paper represents the first description of *Cryspovirus* in *Cryptosporidium* of human origin in France.

The *Cryspovirus* is an RNA virus that has a very peculiar, vertical-only, transmission mode. Its presence seems to be linked to increased fecundity and infectivity. No mode of action is currently identified; however, it is likely that the virus can activate the interferon gamma signaling way in the mammalian host, which allows the parasite to evade the immune system.

During the experiments, we observed an 85% positivity rate to CSpV-1. Further experiments must be carried out with cell culture to precisely quantify the effect of *Cryspovirus* infection of *Cryptosporidium*.

KEYWORDS: CRYPTOSPORIDIOSIS, CRYPTOSPORIDIUM, CRYSPOVIRUS, PARASITIC DISEASE, EPIDEMIOLOGY, ENDOSYMBIOSIS, VIRUS

JURY:

Chairperson: Pr Sophie LE PODER

Thesis Director: Pr Karim ADJOU

Reviewer: Dr Bruno POLACK

Guest: Dr Nolwenn DHEILLY