REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

Etude histologique de la cryptosporidiose caprine

Présenté par:

Benyahia Nour El Houda Yaala Nadia Mazouzi Lynda

Devant le jury composé de :

Chami.B	MAA	A l'U.Y.F.M	Président
Benhafri.N	MAA	A l'U.Y.F.M	Examinateur
Benadji.MA	MAA	A l'U.Y.F.M	Encadreur

Année universitaire : 2019 /2020

Remerciements

Au terme de ce travail :

Nous tenons a remercie DIEU le tout Puissant pour Nous avoir préservé, donné la santé et guidé vers la connaissance et le savoir.

Nous tenons vivement à remercie notre promoteur

Mr BENNADJI MOHAMED AMINE

Pour avoir accepté la charge d'encadrer ce travail, son sérieux, sa rigueur et sa patience

Les membres du jury

A tous ceux qui nous ont enseigné pendant toute notre vie.

Nous adressons nos vif remerciements aux personnes ayant coopéré de près ou de loin a l'élaboration de ce travail.

Merci

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail :

A tous ceux qui témoignent qu'il n y a de Dieu qu'Allah et que Mohamed est son prophète.

A ceux qui m'ont soutenu, m'ont encouragé durant toute ma période d'étude, et pour leurs sacrifices consentis. A ceux qui ont toujours voulu que je soin le meilleur.

A mes parents : Ahmed, Bouzida Yamina. Pour avoir toujours cru en moi et m'avoir permis d'arriver jusqu' ici j'espère que vous êtes fière de moi.

A mes chères frères et sœurs : Omar, Mohamed, Messouda, Akila Hassan, Houcine, maroia, fares. Pour leur soutien et leur confiance durant toutes ces années d'études.

A mes amies pour tout ce que l'on partage.

A la famille Mokhtari.

A mes binômes : Lynda et Nadia qui j'ai partagé les aléas de ce travail ; les bons comme les mauvais moments.

Et enfin à toute ma promotion et mes camarades sans exception.

Benyahia Nour Elhouda

Dédicace:

Je dédie ce modeste travail :

A tous ceux qui témoignent qu'il n y a de Dieu qu'Allah et que Mohamed est son prophète.

A ceux qui m'ont soutenu, m'ont encouragé durant toute ma période d'étude, et pour leurs sacrifices consentis. A ceux qui ont toujours voulu que je soin le meilleur.

A mes parents : Omar, Elarem, Pour avoir toujours cru en moi et m'avoir permis d'arriver jusqu' ici j'espère que vous êtes fière de moi.

A mes frères : Brahim, Chemse éddin, Sid Ahmed et ma sœur : Iman. Pour leur soutien et leur confiance durant toutes ces années d'études.

A mes amies pour tout ce que l'on partage.

A la famille Mokhtari.

A mes binômes : Nadia et Nour Elhouda qui j'ai partagé les aléas de ce travail ; les bons comme les mauvais moments.

Et enfin à toute ma promotion et mes camarades sans exception.

Mazouzi Lynda

Dédicace:

Je dédie ce modeste travail

A tous ceux qui témoignent qu'il n y a de Dieu qu'Allah et que Mohamed est son prophète.

A ceux qui m'ont soutenu, m'ont encouragé durant toute ma période d'étude, et pour leurs sacrifices consentis. A ceux qui ont toujours voulu que je soin le meilleur.

A mes parents : Azzazi, Saida. Pour avoir toujours cru en moi et m'avoir permis d'arriver jusqu' ici j'espère que vous êtes fière de moi.

A mon frères : Mohamed et mes sœurs : Chaima, Rihab. Pour leur soutien et leur confiance durant toutes ces années d'études.

A mes amies pour tout ce que l'on partage.

A la famille Mokhtari.

A mes binômes : Lynda et Nour Elhouda avec qui j'ai partagé les aléas de ce travail ; les bons comme les mauvais moments.

Et enfin à toute ma promotion et mes camarades sans exception.

Yaala Nadia

Résumé

La cryptosporidiose est une protozoose à répartition mondiale. elle est causée par un parasite nommé *Cryptosoridium spp* ; qui occasionne une diarrhée liquide et profuse. Les conditions d'apparition de la maladie sont mal connues .Les caprins, et particulièrement les jeunes sont considérés comme l'espèce la plus sensible avec des fréquences accrues de morbidité et de mortalité.

Notre étude vise à comprendre l'épidémiologie de la cryptosporidiose et l'évaluation de la prévalence de cette parasitose chez les caprins dans les différentes régions de Médéa. Un total de 90 prélèvements de matières fécales ont été récoltés de différents élevages des caprins, de tout âge. Deux méthodes de diagnostic ont été utilisées pour la mise en évidence de *Cryptosporidium spp*, la technique de Ritchie pour l'enrichissement suivi de la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée aussi la technique de coupe histologique.

A la fin de cette étude on a noté que *Cryptospridium spp* est à l'origine d'un syndrome gastro-entéritique chez les nouveau-nés bien que toutes les classes d'âges et les deux sexes puissent être infectés par le parasite.

Mots clés : cryptosporidiose, caprins, Médéa, Ziehl-Neelsen, Ritchie, gastro-entérite.

Summary

Cryptosporidiosis is a protozoan with worldwide distribution, it is caused by parasite called *crytosporiduim spp*. Wich causes liquid and profuse diarrhea. The conditions of the onset of the disease are poorly understood. the goats , and especially young are considered the most sensitive species, with increased frequencies of morbidity and mortality.

Our stydy aims to understand the epidemiologiy of cryptosporidiosis and the evaluation of the prevalence of this parasitosis in goets in the different regions of Médéa. A total of 90 samples of faeces were collected from different farms of goats, of all ages.two diagnostic methods were used For the detection of crytosoridium spp, the ritchie technique for enrichment followed by the modified zeihl-Neelsen staining also the histological section technique.

At the end of this stydy, it was noted that *cryptosporidium spp* is the cause gastroenteritic syndrome in newborns although all age groups and both sexes can be infected with the parasite.

Keywords : Cryptosporidiosis, goats, Médéa, zeihl-neelsen, ritchie, gastroenteritis.

ملخص

كريبتوسبوريديوس هومرض طفيلي ينتشر في جميع انحاء العالم . وسببه هو الطفيلي المعروف باسم كريبتوسبوريديوم الذي يسبب الإسهال الشديد. شروط ظهور المرض غير معروفة بشكل جيد. الماعز وخاصة الصغار يعتبر النوع الأكثر حساسية مع نسبة مرضى و وفيات مرتفعة.

تهدف دراستنا الى فهم هذا الوباء و تقييم مدى انتشار هذا الطفيلي عند الماعز في مختلف مناطق ولاية المدية. مجموع 90 عينة من البراز تم جمعها من مختلف مزارع الماعز بمختلف الأعمار. تم استخدام طريقتين للكشف عن كريبتوسبوريديوم تقنية ريتشي للإثراء تليها زيل نيلسن المغيرة للتلوين.وأيضا تقنية القسم النسيجي.

في نهاية هذه الدراسة نلاحظ أن الكريبتوسبوريديوم هو أصل متلازمة الجهاز الهضمي عند حديثي الولادة على الرغم من أن جميع الفئات العمرية بكلى الجنسين يمكن أن تصاب بالطفيلي

الكلمات المفتاحية: كريبتوسبوريديوس,الماعز,الجهاز الهضمي , زيل نيلسن, المدية, ريتشي.

Table de matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre I : Généralités sur la cryptosporidiose 3

1 Définition 4

2 Historique 4

3 Taxonomie 5

3.1 Position taxonomique 5

3.2 Les différentes espèces du genre 6

4 Biologie de parasite 8

4.1 Structure de l'oocyste 8

4.2 La morphologie de parasite 8

5 Cycle de parasite 9

5.1 Caractéristique 9

5.2 Déroulement de stades parasitaires 10

5.3 Particularité de cycle 13

6 Mesure de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes 14

6.1 Viabilité des oocystes 14

6.2 Infectiosité des oocystes 14

7 Résistance de parasite dans le milieu extérieur 15

8 Position dans la cellule-hôte 15

9 Pathogénie 16

9.1 Adhérence 16

9.2 Production de toxine 17

9.3 Lésions cellulaires 17
9.4 Apoptose 17
10 Réponse immunitaire à l'infection à *Cryptosporidium* 18
10.1 La réponse immunitaire innée 18
10.2 La réponse immunitaire acquise 18
10.3 La réponse humorale 18
10.4 La réponse cellulaire 19
Chapitre II : La cryptosporidiose chez les caprins 20
1 Epidémiologie 21
1.1 Epidémiologie descriptive 21
1.1.1 Répartition géographique 21
1.1.2 Prévalence 21
1.1.3 Espèces cibles 21
1.2 Épidémiologie analytique 23
1.2.1 Source d'infection et dose infectante 23
1.2.2 Dose infectante 23
2 Mode de transmission 24
3 Critères de sensibilité de l'hôte 24
3.1 Espèce 24
3.2 La race 25
3.3 L'âge 25
3.4 Le statut immunitaire 25
4 Facteurs favorisants de la contamination 25
4.1 Chez l'oocyste 25
4.2 Chez l'hôte 26
Chapitre III : Tableau clinique et lésionnel du parasite 27
1 Symptômes 28
2 Les lésions 29
3 Diagnostic 30
3.1 Diagnostic épidémiologique et clinique 30

3.2 Diagnostic différentiel 30
3.2.1 Bactérienne 30
3.2.2 Virale 31
3.2.3 Protozoaire 31
3.3 Diagnostic au laboratoire 34
3.3.1 Les techniques de concentration 34
3.3.1.1 Techniques de sédimentation 34
3.3.1.2 Techniques de flottation 35
3.3.2 Les techniques de coloration 35
3.3.2.1 Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée 35
3.3.2.2 Coloration de Heine 36
3.3.2.3 Coloration au Giemsa 37
3.3.2.4 Coloration acide rapide de kinyoun 37
3.3.2.5 Technique auramine O 38
3.3.3 Méthodes immunologiques 39
3.3.3.1 Immunofluorescence directe 39
3.3.3.2 ELISA 40
3.3.3.3 Test d'agglutination au latex 40
3.3.4 Cytométrie de flux 41
3.3.5 Tests immunochromatographique 41
3.3.6 Biologie moléculaire 41
3.3.7 Examen histologie 42
4 Traitement 43
5 Prophylaxie 43
Matériels et Méthodes 45
1 Objectif 46
3 Matériels et méthodes 46
3.1 Analyse coprologique 46
3.2 La Coupe histologique 55
Conclusion 63

Liste des tableaux

Tableau 01	Position taxonomique	**6**
Tableau02	Espèces du genre *Cryptosporidium* considérées comme valides	**7**
Tableau03	Différents stades évolutifs de *Cryptosporidium spp*	**10**
Tableau04	Les espèces de *Cryptosporidium* et leurs hôtes principaux	**22**
Tableau05	Principales causes de diarrhée néonatales chez les chevreaux et les agneaux	**32**
Tableau06	Estimation de la qualité de la morphologie de l'oocyste *Cryptospridium* visualisé par les différentes techniques	**37**

Liste des figures

Figure01	Modèle de la structure en 4 couches de la paroi d'un oocyste de C. parvum	**8**
Figure02	photographie au microscope électronique montrant plusieurs stades de *Cryptosporidium* dans l'épithélium intestinal d'un mouton	**9**
Figure03	cycle biologique de *Cryptosporidium spp*.	**10**
Figure04	Arrière-train souillé d'un chevreau atteint de cryptosporidiose	**29**
Figure05	Oocystes de *cryptosporidium sp* dans les selles coloration Ziehl-Nielsen	**36**
Figure06	Oocystes de Cryptosporidium colorés par la technique de Heine, observés en contraste de phase	**36**
Figure07	Cryptosporidium spp colorée par la méthode de Giemsa	**37**
Figure08	coloration acide rapide de kinyoun, Oocystes de C. Parvum sont de couleur rouge	**37**
Figure09	Coloration d'oocystes de Cryptosporidium à l'auramine-rhodamine	**38**
Figure10	Image d'oocystes de *Cryptosporidium*(en haut à gauche) révélés par des anticorps immunofluorescents	**40**
Figure11	Cryptosporidiose intestinale. Noter la présence des parasites au pôle apical des entérocytes	**43**
Figure12	exemple d'élevages caprins	**47**
Figure13	exemple de boites à prélèvements.	**49**

Figure14	Déposer quelques grammes des selles dans un tube conique.	**49**
Figure15	Verser l'eau formolée dans le tube	**50**
Figure16	agitation à l'aide d'un agitateur.	**50**
Figure17	décantation quelque minute.	**51**
Figure18	aspirer une partie du surnageant	**51**
Figure19	Ajouter un volume d'éther.	**52**
Figure20	Centrifugation des tubes	**52**
Figure21	Tube se répartit en 4 couches	**53**
Figure22	aspirer le culot et déposé sur la lame	**53**
Figure23	Etalement de frottis	**54**
Figure24	Fixation le frottis par méthanol	**54**
Figure25	prélèvement d'un fragment de tissu (biopsie intestinale)	**56**
Figure26	fixation de pièce dans un bain de formol	**57**

Figure27	placer les fragments dans des cassettes	**57**
Figure28	bains de déshydratation (automate)	**58**
Figure29	inclusion des fragments dans les moules de paraffine	**58**
Figure30	réalisation de sections de ruban.	**59**
Figure31	étalement des segments sur les lames.	**60**
Figure32	placer les lames sur une plaque chauffante	**60**
Figure33	coloration des lames	**61**
Figure34	montage des lames par une goutte de baume de canada	**62**
Figure35	*les cryptosoridium* au microscope optique.	**62**

Liste des abréviations

C: *Cryptosporidium.*

IgA: Immunoglobuline de classe A.

IgG: Immunoglobuline de classe G.

IgM : Immunoglobuline de classe M.

NK: NaturalKiller.

CD4: Cluster of Differentiation 4.

CD8: Cluster of Differentiation 8.

PH : potentiel Hydrogène.

Introduction

Les parasites de genre *Cryptosporidium* sont des protistes cosmopolites appartenant au phylum des Apicomplixa et au groupe des coccidies, engendrant une pathologie qui s'appelle la cryptosporidiose. C'est une protozoose opportuniste émergente avec un impact considérable chez un grand nombre de vertébrés, y compris l'homme plus rarement les reptiles et les poissons. Les oocystes hébergeant les sporozoïtes infectants sont éliminés avec les selles des hôtes infectés, contaminent l'environnement, sont fréquemment véhiculés par les eaux où ils gardent leur pouvoir infectieux pendant longtemps, résistant aux désinfectants usuels, par ailleurs, étant immédiatement infectieux après leur excrétion, ils peuvent être transmise directement par contact inter humain.

Cryptosporidium est à l'origine d'un syndrome gastroentéritique et son importance est primordiale chez les nouveau-nés bien que toutes les classes d'âge puissent être infectées par le parasite. Les cryptosporidies colonisent essentiellement les épithéliums digestifs, mais aussi respiratoires, biliaires et urinaires. *Cryptosporidium spp*.est reconnu depuis plus de 40 ans comme étant responsable de diarrhées néonatales chez les petits ruminants. Elle est à l'origine de pertes économiques importantes, que ce soit par le biais des traitements mis en place, mais aussi par les taux de morbidité et de mortalité élevés.

L'importance de la cryptosporidiose n'est pas moindre en matière de santé publique. Chez l'homme sain, l'infection à *cryptosporidium parvum* est généralement bénigne, voir inapparente. La cryptospordiose peut être partiellement prévenue par des mesures d'hygiène très strictes mais celles-ci ne sont pas infaillibles compte tenu des caractéristiques biologiques du parasite (cycle rapide, forte résistance des oocystes) et des incertitudes qui persistent aujourd'hui sur Les mécanismes d'apparition de la maladie. Les possibilités thérapeutiques sont réduites également.

En Algérie, comme dans de nombreux pays, les éleveurs de bétail sont confrontés à des graves pertes économiques en l'absence d'un programme de lutte contre la cryptosporidiose des caprins.

Introduction

Le présent travail s'est tracé comme objectif général d'apporter une contribution originale à la connaissance de l'état de la cryptosporidiose chez les caprins dans la région de Médéa, en découvrant la prévalence d'infestation dans nos troupeaux de caprins dans cette région.

Cette étude vise à présenter le parasite, la maladie, son aspect clinique et son diagnostic, les traitements disponibles et on termine cette partie par les méthodes de prévention contre cette parasitose dans les différentes régions de Médéa.

Chapitre I

Généralités sur la cryptosporidiose

1 Définition

La cryptosporidiose est une parasitose cosmopolite zoonotique due à protozoaire du tube digestif appelée *cryptosporidium sp* se rencontre chez une très large gamme des Vertébrés Mammifères, Oiseaux, mais plus rarement les Reptiles et Poissons. [01]
La cryptosporidiose est une protozoose responsable d'importantes pertes économiques en élevages caprins. Les chevreaux âgés de 5 a 21 jours sont particulièrement sensibles à cette maladie diarrhéique, caractérisée par une morbidité et une mortalité élevées. [02]

2 Historique

La Cryptosporidium spp un neveau genre, apparenté aux Coccidies a tout d'abord été une découverte vétérinaire.

En 1907 : Ernest Edward Tyzzer, parasitologue, en a rapporté le premier cas chez la souris (Mus musculus) [03].

En 1910 : Il nomma ce parasite unicellulaire retrouvé dans les épithélium gastriques de souris de laboratoire :*Cryptosporidium muris* [04]

En 1912, il mit en évidence, une nouvelle espèce, chez la souris : C. parvum.la déférence entre les deux éspèces basé sur la localisation au sein de cellule hôte et le taille (C parvum éspèce de cellule intestinale de taille plus petite) [05]. La *cryptosporidium* présente des stades asexués et sexués, attachement aux cellules épithéliales des hôtes par l'intermédiaire d'organelles spécialisés localisés en position apicale du parasite [(04].

En 1955, slavin fait établir la première association entre signes cliniques et présence de *Cryptosporidium*. En effet, une nouvelle espèce, C. meleagridis, retrouvée dans des cellules intestinales de dinde chez des animaux diarrhéiques a été décrite [06].

En 1970, après avoir été longtemps considéré comme organisme commensal, ce parasite fut reconnu comme agent responsable d épizooties de diarrhées pouvant être mortelles dans les élevages de jeunes veaux [07].

En 1976 : sont identification Chez l'homme est récente puisque les deux premiers cas n'ont été diagnostiqués, le premier cas chez un enfant de trois ans présentant une

gastroentérite (immunocompétente) et le second cas chez un patient immunodéprimé [08]. La maladie est considérée au début comme une affection opportuniste rare. Cette conception est remise en question depuis **1981** avec l'extension du syndrome d'immunodéficience Acquise (SIDA) [09].

En 1984, des épidémies de cryptosporidiose humaine liées à la consommation d'eau Contaminée apparaissent, notamment aux USA [10,11].

En 1990, des techniques de biologie moléculaire ont permis une meilleure connaissance sur la classification de la *Cryptosporidium* ainsi que l'identification des espèces [12].

En Algérie les premiers cas ont été diagnostiqués **en 1992** [13].

En 1996, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé ce parasite comme pathogène ayant une importance en santé publique du fait qu'il soit capable d'infecter à de très faibles doses et de sa grande.

En 2010 une étude montre qu'elle pourrait être responsable de diarrhée chez des chevreaux [14].

En 2011 : Pour les agneaux les premières travaux sur la Cyptosporidiose en Algérie se fait par Dr Hicham Dahmani et al, dans la région de Ksar El Boukhari.

3 Taxonomie

3.1 Position taxonomique

La connaissance sur la taxonomie du genre *Cryptosporidium* et l'identification des espèces reposent sur les outils récents de la biologie moléculaire. De nouvelles données viennent constamment compléter ou corriger l'état actuel des connaissances concernant la systématique de *Cryptosporidium*, qui fait encore l'objet de publications quasi mensuelles**.** *Cryptosporidium* est un protozoaire de l'embranchement des Apicomplexa**.** On a longtemps pensé que Cryptosporidium était apparenté aux coccidies, en raison des nombreuses similitudes de leur cycle biologique. Cependant *Cryptospridium* ne semble pas posséder d'organelle « mitochondria-like », retrouvé chez les coccidies classiques [12].

Tableau 1: Position taxonomique [13 ,15].

Règne	Protiste	Eucaryote unicellulaire
Phylum	Protozoaire	Protiste à affinité animale, hétérotrophe
Embranchement	*Apicomplexa* (sporozoa)	Parasite obligatoire, intracellulaire, complexe apical à certains stades (organe de pénétration dans la cellule hôte)
Classe	*Coccidea*	Reproduction sexuée et asexuée, formation d'oocystes
Ordre	*Eimeriida*	Macro et micro-gamontes se développent indépendamment, zygote non mobile
Famille	*Cryptosporidiidae*	Oocystes à 4 sporozoïtes nus, cycle monoxène
Genre	*Cryptosporidium*	Le seul genre important

3.2 Les différentes espèces du genre

Tyzzer est établi le genre *Cryptosporidium*, La 1ère espèce décrite est *Cryptosporidium muris* qui infecte la souris et un nombre limité d'autres mammifères.

Pour caractériser les espèces de *Cryptosporidium spp*, en plus des critères morphologiques et /ou de spécificités d'hôte, il est nécessaire de prendre en considération l'importance des différences au niveau du site d'infection préférentiel, les critères biochimiques, les critères immunologiques et les critères génétiques [16]. Parmi les 27 espèces de cryptosporidies décrites à ce jour. Mais la taxonomie des espèces de ce genre est en perpétuel changement et reste sujet à discussion pour de nombreux chercheurs [17,18], les hôtes sont variables touchant aussi bien les mammifères, les reptiles, les oiseaux, les amphibiens et les poissons [19].

Certaines éspèces, telle que *Cryptosporidium parvum*, peuvent infecter une grande variété d'hôtes, alors que d'autres semblent spécifiques d'un seul hôte. C'est ainsi que l'on à découvert *C.ubiquitum* ou *C. muris* qui, en fait ce sont révélées être identiques à *C.parvum.*

Six espèces sont aujourd'hui considérées comme valides : [20]: *C. muris, C. parvum, C. meleagridis, C. baileyi, C. serpentis* et *C. nasorum*. Certains auteurs [21, 22, 23] incluent également les espèces suivantes : *C. felis*, *C. saurophilum*, *C. wrairi* et *C. andersoni* localisée à la caillette des bovins.

Tableau 2 : Espèces du genre *Cryptosporidium* considérées comme valides [24].

Espèce	Hôte	Taille oocyste (micromètres)
C. andersoni	Bovins	7,4 × 5,5
C. baileyi	Oiseaux	6,2 × 4,6
C. felis	Chat	4,6 × 4,0
C. meleagridis	Oiseaux	5,2 × 4,6
C. muris	Souris, Bétail	8,4 × 6,3
C. nasorum	Poissons	4,3 × 3,3
C. parvum	Souris, Bétail, Homme…	5,0 × 4,5
C. saurophilum	Lézards	5,0 × 4,7
C. serpentis	Reptiles	6,2 × 5,3
C. wrairi	Cochon d'Inde	5,4 × 4,6

4 Biologie de parasite

4.1 Structure de l'oocyste

L'oocyste est de forme variable, ovoïde à elliptique, et mesure entre 4,5 et 7,9 µm de long pour 4,2 à 6,5 µm de large [20]. La paroi de l'oocyste est constituée de 4 couches :

O La couche externe, le glycocalyx, est principalement composée de sucres. Cette Structure apparaît dense aux électrons en microscopie électronique. Elle confère les Caractères d'immunogénicité ainsi que d'attachement du parasite à la cellule-hôte. Les préparations pour l'étude microscopique des oocystes peuvent provoquer des Altérations du glycocalyx.

O La deuxième couche, majoritairement composée de lipides complexes, laisse passer Les électrons en microscopie électronique. Elle serait à l'origine de la faiblesse de la Paroi de l'oocyste;

O La troisième couche est une fine couche apparaissant dense aux électrons. Elle abrite les principales protéines structurales de la paroi de l'oocyste, à l'origine de sa force et de sa flexibilité.

O La couche interne est composée d'hydrates de carbone et de polysaccharides de structure [26]

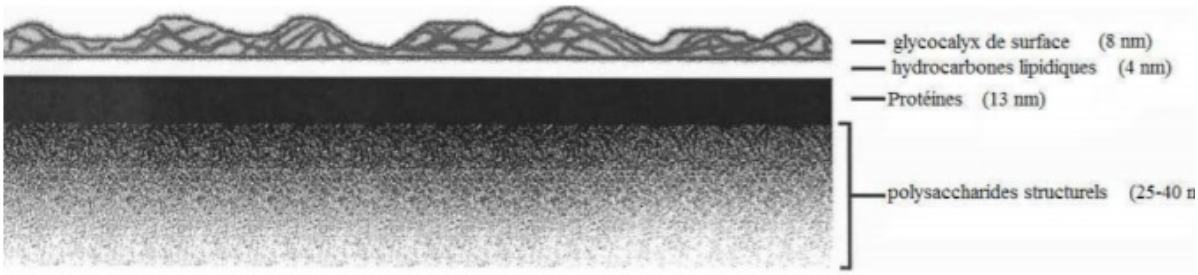


Figure 01: Modèle de la structure en 4 couches de la paroi d'un oocyste de *C. parvum* (26).

4.2 La morphologie de parasite

Le parasite a une forme sphérique à elliptique et sa taille varie de 2 à 6µm de diamètre ce qui est relativement petit par rapport aux autre coccidies. Il occupe une position dans la cellule épithéliale très particulière, en zone apicale**,** jamais en profondeur [20].

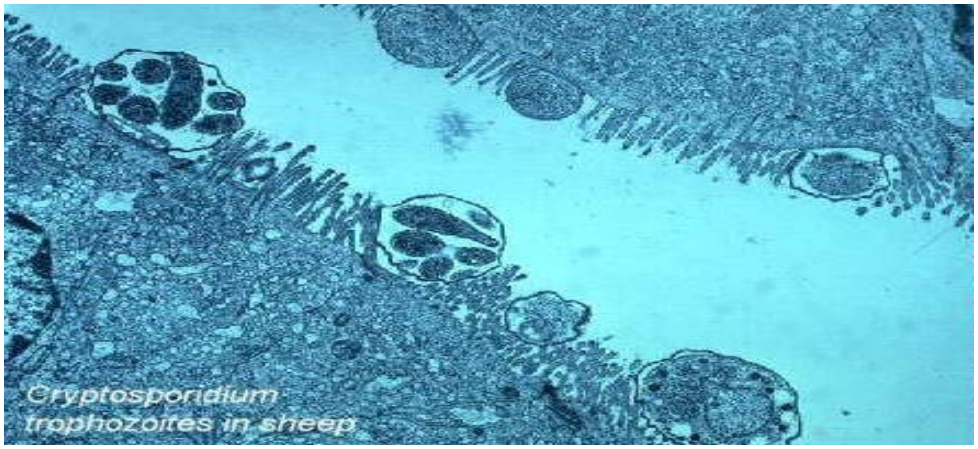


Figure 02 : photographie au microscope électronique montrant plusieurs stades de *Cryptosporidium* dans l'épithélium intestinal d'un mouton [21].

5 Cycle de parasite

5.1 Caractéristique

Toutes les espèces de *Cryptosporidium* sont des parasites intracellulaires obligatoires. [12] C 'est un parasite monoxène c'est-à-dire un seul hôte qui peut effectuer son cycle évolutif en trois ou quatre jours [27]. La phase exogène est maintenue par des formes de résistance et de dissémination dites oocystes. La période pré-patente, c'est-à-dire la durée s'écoulant entre le moment de l'ingestion des oocystes et leur excrétion, est comprise entre 2 et 14 jours, et la période de patence, correspondant à la durée totale d'excrétion des oocystes, est comprise entre quelques jours à plusieurs mois [12] [28].

Le cycle se déroule dans les cellules épithéliales de l'intestin ou du tractus gastro-intestinal plus généralement, cependant des localisations erratiques sont possibles comme l'arbre respiratoire, la vésicule biliaire, le foie ou le pancréas [12]. Les oocyste vont excyster sous l'action de la trypsine et des sels biliaires et ainsi libérer son contenu soit quatre sporozoïtes (éléments invasifs).

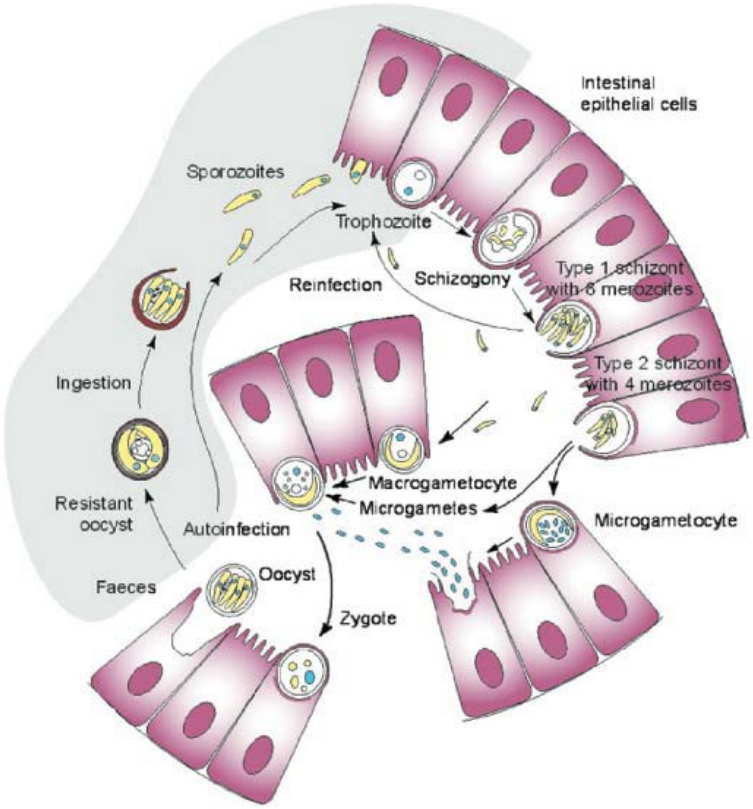


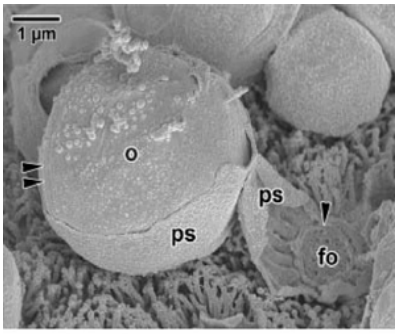
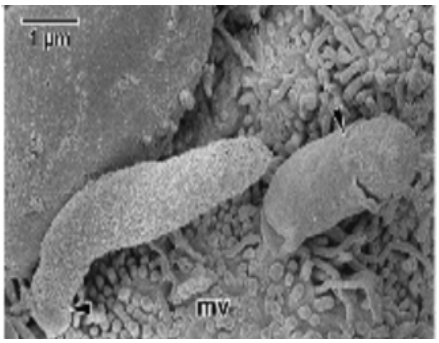
Figure 03: cycle biologique de *Cryptosporidium sp* [29].

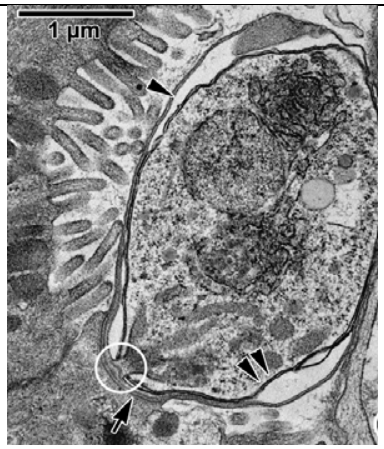
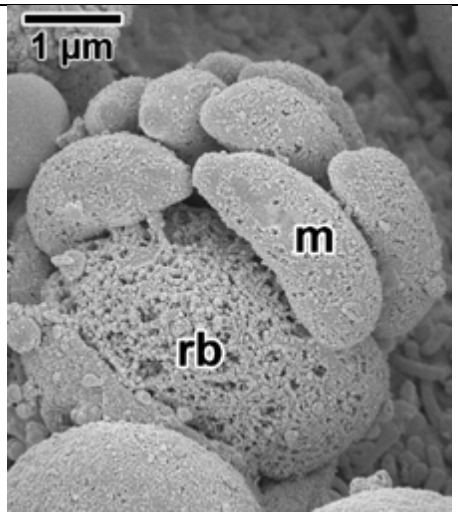
5.2 Déroulement de stades parasitaires

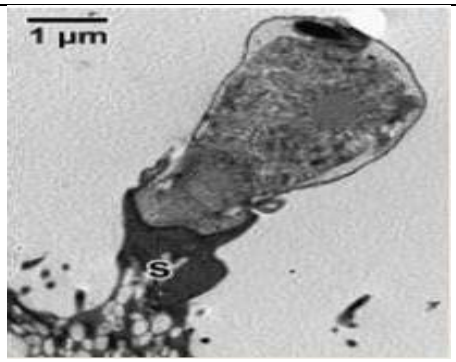
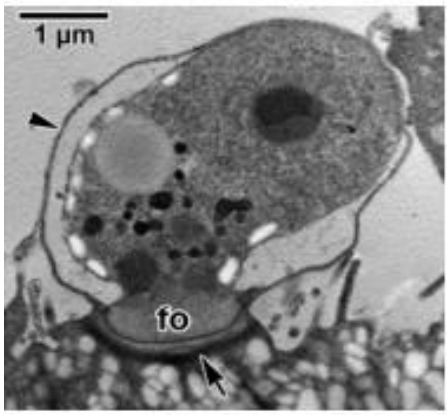
La morphologie des différents stades parasitaires de *Cryptosporidium* est décrite dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Différents stades évolutifs de *Cryptosporidium sp* [30, 31].

Formes Evolutives	Images	Description

Oocystes	 o :oocyst ps : vacuole parasitophore (« parasitophorus sac » fo : organelle nourricier (« feeder organelle »)	1. Forme sphérique à ovoïde. 2. La taille de l'oocyste varie entre 2 et 6 µm de diamètre, selon l'espèce. 3. Ils contiennent 4 sporozoïtes vermiformes nus c'est à dire non contenus dans des sporocystes. 4. sa paroi est composée de deux couches, interne et externe, bien distinctes. 5. A l'un de ses pôles, se situe une fente qui s'étend sur 1/3 à 1/2 de leur circonférence par laquelle sont libérés les sporozoïtes.
Sporozoïte et merozoïte	 mv : microvillosités	1. Ils sont élancés, virguliformes. 2. Formes libres et mobiles. 3. Présence d'un complexe apical.

Trophozoïte		Ils sont arrondis ou ovalaires en position intracellulaire ; 2 à 2,5 µm de diamètre.
Méronte	 m : merozoïtes rb: corps résiduel	1. Méronte de type I contenant six à huit mérozoïtes. 2. La membrane cellulaire de la cellule hôte entourant le méronte se lyse et les mérozoïtes deviennent extracellulaires, capables d'infecter d'autres cellules hôtes pour produire de nouveaux mérontes type I ou peuvent évoluer vers des mérontes type II à quatre mérozoïtes.
Microgamonte		1. Ils ressemblent aux mérontes, mais contiennent des noyaux plus petits. 2. Des divisions nucléaires successives dans le microgamontes forment de microgamètes. 3. Ils sont une forme en tige avec

		une extrémité antérieure aplatie 4 à 5µm de diamètre.
Macrogamonte	 fo : organelle nourricier	1. Forme sphérique à ovoïde. Il présente en position centrale un grand noyau à nucléole proéminent, 3.2 à 5 µm de diamètre. 2. Les microgamètes fécondent les macrogamètes pour produire un zygote qui évolue en oocyst.
Zygote		1. Zygote mûr mais toujours connecté via l'organelle nourricière à la cellule hôte.

5.3 Particularité de cycle

Les particularités du cycle de *Cryptosporidium* par rapport à celui des autres coccidies consistent en l'excrétion d'oocystes directement infectants, le recyclage des mérozoïtes de

1ère génération et la formation d'oocystes à paroi fine (20%) qui des enkystent immédiatement *in situ* (non éliminés avec les selles), entretenant l'infection. Ces particularités expliqueraient le maintien de l'infection chez les sujets immunodéprimés [32].
Le cycle du parasite est court et permet une surinfection de l'hôte de même qu'une libération massive d'oocystes à paroi épaisse dans le milieu extérieur à l'origine d'une infection rapide de nouveaux hôtes.

6 Mesure de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes

La mesure de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes est une étape primordiale visant à évaluer la résistance des oocystes en conditions naturelles ou expérimentales et ainsi valider ou non des études sur la désinfection.

6.1 Viabilité des oocystes

La viabilité des oocystes est la capacité d'un oocyste à libérer les 4 sporozoïtes qu'il contient. Elle peut être évaluée par la mise en évidence du dékystement des oocystes in vitro ou par différentes colorations vitales.
L'estimation de la viabilité du parasite peut également être obtenue par l'utilisation de colorants vitaux : le 4,6, diamidino-2'-phenylindole (DAPI) qui traverse les membranes et l'iodure de propidium (PI) qui a pour particularité de ne pas pénétrer les oocystes viables [33].

6.2 Infectiosité des oocystes

L'infectiosité est la capacité des sporozoïtes libérés à pénétrer les cellules intestinales de l'hôte. Elle peut être déterminée grâce au modèle souriceau BALB/c-NMRI nouveau-né. Il permet de suivre l'excrétion des oocystes chez l'animal : après inoculation par voie orale, les souriceaux sont sacrifiés au bout de quelques jours et des analyses histologiques sont réalisées pour mettre en évidence des oocystes dans le tube digestif.
L'infectiosité des oocystes est exprimée en pourcentage d'animaux trouvés infectés : il s'agit du nombre d'animaux infectés, divisé par le nombre d'animaux inoculés, multiplié par 100. L'infection et la croissance du parasite sont quantifiables grâce à l'immunofluorescence,

l'hybridation in situ, la PCR (Polymerase Chain Reaction) ou la RT-PCR (Reverse-Transcription PCR) [34].

7 Résistance de parasite dans le milieu extérieur

Les oocystes de *Cryptosporidium parvum* sont très résistants dans le milieu extérieur, que ce soit dans l'eau, le sol ou bien les matières fécales, la difficulté du traitement et de la désinfection de parasite explique la survie dans les différents substrats. Les oocystes de *Cryptosporidium* demeurent viables pendant quatre à douze mois dans les sols humides et dans l'eau entre 4 et 20°C [25].

Les pH acides semblent plus favorables à la survie des oocystes comme le suggère la plus grande quantité d'oocystes retrouvée dans des sols de fermes au pH acide par rapport à des sols aux pH neutre et basique aux Etats-Unis [34]. L'exposition à des températures très basses conduit à une inactivation partielle des oocystes (67%). la congélation à-10°C pendant 7 jours ils demeurent viables [35]. Les oocystes traités à 72°C pendant seulement cinq secondes sont tués (36]. La résistance est augmentée dans les matières fécales qui préservent les oocystes de la dessiccation [37], dépendrait de trois paramètres :

o La température : des températures élevées et des phases de gel et de dégel alternées réduisent la viabilité des oocystes ;

o Le temps : l'obscurité tend à diminuer la viabilité ;

o La concentration en ammoniaque : des concentrations élevées peuvent entraîner une inactivation des oocystes [33].

Les oocystes sont remarquablement résistants aux désinfectants utilisés couramment (composés alcalins ou contenant des aldéhydes, ammoniaques, du chlore ou de l'alcool) [20].

La viabilité des oocystes est altérée lors d'une exposition à de l'ammoniac à 3% [38], ainsi que seul le dioxide de chlore à 1,3 ppm, l'ammoniac à 5% ou le formaldéhyde à 10% sont efficaces pour détruire les oocystes de *Cryptosporidium* [39].

8 Position dans la cellule-hôte

Le genre *Cryptosporidium* occupe une place tout à fait unique dans la cellule puisque le parasite est en position intracellulaire mais extra cytoplasmique. Lors du contact du parasite avec la cellule-hôte, des enzymes (notamment des rhoptries et des micronèmes) sont libérées entrainant l'englobement du parasite par des microvillosités de la membrane apicale de l'hôte et ainsi la formation de la membrane de la vacuole parasitophore. Cependant *Cryptosporidium* n'est qu'en partie entouré de cette membrane et prélève une majorité de ses nutriments grâce à l'organe de nutrition. Celui-ci a une origine double puisqu'il dérive à la fois du parasite et de l'hôte. La localisation très protégée de *Cryptosporidium* au sein de la cellule-hôte peut expliquer les échecs de traitement contre le parasite. L'organe de nutrition pourrait notamment bloquer l'entrée de molécules dans le parasite protégeant celui-ci de l'action de molécules à activité intracellulaire [20].

9 Pathogénie

Cryptosporidium parvum est un parasite qui se localise dans la bordure microvillositaire des entérocytes et se développe dans une vacuole parasitophore. Cette position caractéristique dans la cellule hôte est qualifiée d'intra-cellulaire mais extra-cytoplasmique. C'est un parasite qui peut produire des anomalies significatives dans les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin. Ces altérations épithéliales sont probablement le résultat soit d'atteintes directes de la cellule épithéliale de l'hôte, soit des perturbations indirectes causées après recrutement de cellules et de cytokines pro-inflammatoires, soit des deux effets associés. Le résultat final serait la diarrhée [40]. Les facteurs spécifiques de virulence de *Cryptosporidium* n'étaient pas bien connus. Néanmoins, certaines molécules candidates ont été identifiées par des méthodes immunologiques et moléculaires, et certains mécanismes associés à la pathogénicité ont été décrits [41].

9.1 Adhérence

Pour établir l'infection, l'étape initiale critique est l'attachement du parasite aux cellules hôtes. Récemment, plusieurs molécules probablement associées à l'adhérence ont été caractérisées comme par exemple le CSL (circumsporozoïte -like) [42], la gp900, le complexe

gp15/40/60 [43], TRAP-C1 et TRAP-C2 (thrombospondin related adhesion proteins) [44], la cp47 [45] et la Cps 500 [46].

9.2 Production de toxine

La diarrhée est le symptôme le plus caractéristique de la cryptosporidiose, mais le mécanisme spécifique par lequel le *Cryptosporidium* induit la diarrhée n'a pas été identifié. Des études précédentes ont postulé que *Cryptosporidium* produirait une entérotoxine responsable de la diarrhée sécrétoire profuse. Plusieurs observations soutiennent cette idée. La di minution du flux d'anions en présence d'inhibiteurs de cyclo-oxygénase a mené à l'hypothèse d'une activité potentielle entérotoxigène de *Cryptosporidium*. Celle-ci impliquerait la sécrétion des prostaglandines par les cellules épithéliales intestinales infectées [47].

9.3 Lésions cellulaires

En infectant des cultures en monocouche d'entérocytes avec *Cryptosporidium*, des altérations cellulaires ont été documentées comme la rupture des jonctions inter-cellulaires, la perte de la fonction barrière et la libération de lactate déshydrogénase intracellulaire [48]. Les mécanismes impliqués dans la rupture des membranes pendant l'invasion de *Cryptosporidium* demeurent inconnus. Les phospholipases, les protéases, ou les hémolysines sont des molécules qui peuvent potentiellement altérer directement les tissus. Une protéine spécifique de *Cryptosporidium* pourrait être associée à l'invasion cellulaire et à la perte de fonction barrière. C'est l'hémolysine H4 codée par le gène hemA [49].

9.4 Apoptose

Plusieurs groupes ont suggéré que *Cryptosporidium* était cytopathogène vis-à-vis des cellules épithéliales directement infectées mais également des cellules non infectées. En utilisant des cellules épithéliales biliaires en culture, Chen et al. Ont démontré que cet effet cytopathogène est lié à l'apoptose des cellules infectées et des cellules non infectées au moment de l'entrée du parasite dans la cellule [50]. Le parasite peut moduler l'apoptose en favorisant la mort programmée de celles-ci au moment de l'infection, et en inhibant

l'apoptose après l'infection, afin probablement de faciliter sa croissance dans de cellules infectées [51].

10 Réponse immunitaire à l'infection à *Cryptosporidium*

10.1 La réponse immunitaire innée

Constitue un ensemble de mécanismes (barrières physiques, phagocytose, réaction inflammatoire) mis en place immédiatement lors de l'infection, elle est non spécifique de l'agent pathogène rencontré. Chez les souris, l'acquisition d'une flore intestinale mature serait associée à une résistance au parasite. Elle stimulerait des mécanismes non spécifiques tels qu'une possible production d'interféron gamma indépendamment de la voie des lymphocytes T [20].

10.2 La réponse immunitaire acquise

Spécifique de l'agent pathogène, est plus tardive mais durable dans le temps. Elle est également à l'origine de la mémoire immunitaire. Elle comprend la réponse humorale et la réponse cellulaire.

10.3 La réponse humorale

Fait intervenir les anticorps, ou immunoglobulines, produits par les lymphocytes B.Des anticorps spécifiques IgA, IgM et IgG ont été détectés dans le sérum de veaux, agneaux, souris et poulets infectés par le parasite [20]. Ces anticorps sont capables de se lier à des antigènes de taille très variable, par exemple l'antigène p23 présent sur les sporozoïtes, et sont excrétés dans la lumière intestinale. Ces antigènes présentent un intérêt majeur en thérapeutique: ils induisent la production d'anticorps neutralisants fournissant ainsi une possible protection contre la maladie [52].

Ces anticorps excrétés dans la lumière de l'intestin peuvent se retrouver dans les fèces des animaux, une partie semble provenir du transfert passif d'anticorps depuis le colostrum. Une étude a montré que les différentes classes d'anticorps ne sont pas excrétées dans les fèces au même moment après l'infection: les IgG 1 sont détectées à partir du 5ème jour après l'infection tandis qu'il faut attendre le 7ème jour pour voir apparaitre les IgG 2 [52]. Selon l'augmentation des taux d'anticorps fécaux serait corrélée à la diminution du nombre d'oocystes excrétés

chez les agneaux infectés. Ces informations suggèrent que les anticorps sont capables de neutraliser les formes libres du parasite cependant ils seraient inefficaces sur les stades intracellulaires et leur courte durée de vie limiterait leur efficacité [20].

10.4 La réponse cellulaire

Met en jeu les lymphocytes T, cytotoxiques et auxiliaires, et les cellules NK. Des études ont montré que la réponse immunitaire acquise se met en place dans l'intestin avant même le début des signes cliniques. Des lymphocytes T CD4+ et CD8+ ainsi que des cytokines (IL-10) ont été observés dans les villosités, la lamina propria et les plaques de Peyer de l'iléon peu après l'infection. Cependant, à 3 jours post-inoculation, la présence de l'IL-10 et l'absence de l'interféron gamma provoquent une inhibition de la réponse Th1 et donc un développement de l'infection et de la diarrhée [52]. La guérison de l'animal est associée à la production d'anticorps et à une réponse Th1 (par la production d'interféron gamma) dans la muqueuse intestinale [52]. Selon Certaines études, les lymphocytes CD4+ auraient un rôle dans la durée de l'infection tandis que l'interféron gamma limiterait la sévérité de celle-ci [20].

Chapitre II

La cryptosporidiose chez les caprins

1 Epidémiologie

1.1 Epidémiologie descriptive

1.1.1 Répartition géographique

La répartition géographique de *Cryptosporidium sp* est cosmopolite et les travaux de la littérature montrent son existence sur les six continents, tant en zones urbaines qu'en zones rurales. Il est bien codifié à l'heure actuelle que *Cryptosporidium sp*.est responsable de diarrhée dans tous les pays du monde, mais la prévalence de la cryptosporidiose est plus élevée dans les pays en voie de développement [53].

1.1.2 Prévalence

La prévalence représente le pourcentage d'animaux infectés par *Cryptosporidium sp* dans une population donnée à un instant donné [54]. Cette estimation peut varier en fonction de la population de départ, de son âge, de ses conditions de vie, des techniques de détection des individus atteints ou bien encore du lieu de l'étude. Il est donc difficile de donner un chiffre brut pour évaluer la prévalence de la maladie chez les ruminants. Plutôt que de prévalence de la maladie, il vaut mieux parler de prévalence d'excrétion car la plupart des études se basent sur la mesure du nombre d'animaux excréteurs indépendamment de leur statut clinique et non pas sur le nombre d'animaux malades [54].

L'âge des animaux présente également une grande influence sur la prévalence d'excrétion chez les petits ruminants. Ainsi, chez les animaux non sevrés et non diarrhéiques, elle varie de 2 à 85% pour les agneaux et de 5 à 30% pour les chevreaux. La plus forte prévalence (76%) est rapportée pour des agneaux âgés de 8 à 14 jours. La prévalence chez les adultes, bien que moindre, est comprise entre 2,1 et 5,3% selon des études menées en Espagne et en Chine sur des brebis, et entre 7,7 et 9% selon une étude sur des chèvres en Espagne [55].

1.1.3 Espèces cibles

L'utilisation de la biologie moléculaire a permis l'étude plus fine des espèces du genre *Cryptosporidium* retrouvées chez les caprins. L'espèce C. *parvum* est l'espèce

majoritairement retrouvée chez le chevreau non sevré, lors d'épisodes de diarrhée ou non [56,57]. Plus récemment, il a été mis en évidence la présence de C. *xiaoi* chez les chevrettes de moins de 21 jours présentant de la diarrhée [58].

Les humains sont essentiellement infectés par C.*hominis* et C.*parvum* .L'agent de la cryptosporidiose du chevreau est donc zoonotique [59].

Actuellement, 14espéces de *cryptosporidium* sont répertoriées .elles figurent, ainsi que leurs hôtes principaux, dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Les espèces de *Cryptosporidium* et leurs hôtes principaux [59].

Espèces	**Hôte principale**
C.*andersoni*	Bétail et camélidés
C.*baileyi*	Oiseaux
C.*canis*	Chiens
C.*felis*	Chats
C.*hominis*	Humains et singe
C.*meleagridis*	Oiseaux et humains
C.*muris*	Rongeurs et camélidés
C.*nasorum*	Poissons
C.*parvum*	Humains et les autres mammifères
C.*saurophilium*	Reptiles

C.*serpentis*	Serpents
C.*wrairi*	Cobayes
C.*galli*	Oiseaux
C.*suis*	Porcs

1.2 Épidémiologie analytique

1.2.1 Source d'infection et dose infectante

Les infections à *Cryptosporidium* se transmettent par voie féco-orale [60]:
Chez les ruminants les oocystes peuvent être ingérés lors de la consommation d'aliments ou d'eau souillés, par léchage du pelage ou de la litière, ou bien, lors de contact avec du matériel d'élevage contaminé [61,62]. Les jeunes ruminants sont la principale source d'oocystes dans l'environnement. Ils rejettent des oocystes dans leurs fèces en grande quantité, en particulier pendant la deuxième semaine de leur existence [63]. Les ruminants adultes sont très rarement malades mais jouent cependant un rôle de réservoir du parasite en raison d'une excrétion résiduelle à faible niveau [23,64, 65].
Cryptosporidium spp a été isolé chez une grande variété d'animaux sauvages (cervidés, rongeurs, insectivores et lagomorphes), qui pour certains, partagent leurs habitats avec des animaux de ferme, fournissant alors une source additionnelle d'oocystes pour la contamination de l'environnement et favorisant la contamination du bétail [66].

1.2.2 Dose infectante

L'influence de la dose infectante sur l'apparition de la maladie a été étudiée par plusieurs auteurs. Il n'y a pas une différence entre l'infection naturelle ou expérimentale concernant les signes cliniques ou l'excrétion des oocystes et la réponse immunitaire [67].Néanmoins, la période prépatente est de quelques jours plus long dans les infections expérimentales avec une faible dose infectante [68]. La dose infectante minimale sur des Agneaux gnobiotiques peut même correspondre à Un oocyste simple, et la dose infectante

moyenne est de 5 oocystes [68]. Donc Un nombre très faible d'oocystes sont suffisants pour transmettre l'infection.

2 Mode de transmission

La voie d'infection la plus commune est un contact étroit avec les fèces diarrhéiques des caprines malades La transmission entre les animaux peut se faire directement c'est-à-dire d'animal à animal ou indirectement via l'eau utilisée pour la désinfection, le personnel qui s'occupe des animaux, les locaux ou le matériel utilisé... Les oocystes étant très résistants, tout ce qui n'est pas drastiquement désinfecté peut véhiculer des oocystes [54].
Les oocystes sont très souvent retrouvé dans les eaux de surface :

- Consommation d'eau souillée.
- Bains en eau contaminé.
- Dépôt de fumier sur les prairies.
- Contacte directe entre les agneaux et les surfaces aquatiques.
- Transmission alimentaire [69].

3 Critères de sensibilité de l'hôte

3.1 Espèce

La cryptosporidiose infecte un très grand nombre d'espèces animales aussi bien domestiques que sauvages. Parmi les Ruminants domestiques, qui présentent un intérêt en raison des pertes économiques générées par la maladie, les caprins sont les plus sensibles [70]. Dans les cheptels caprins atteints la morbidité atteint fréquemment les 80% et la mortalité peut dépasser les 50% [71].

3.2 La race

En ce qui concerne les Ruminants, les différences de prévalence de la maladie entre les races allaitantes et les races laitières seraient dues à des différences dans le mode d'élevage de celles-ci, les races allaitantes étant élevées sur un mode extensif seraient ainsi moins sensibles au parasite [72].

3.3 L'âge

La cryptosporidiose est essentiellement une maladie du nouveau-né. La plupart des cas cliniques se produisent entre l'âge de 4 et 15 jours chez les chevreaux, chez les adultes, la maladie est généralement asymptomatique [55].

3.4 Le statut immunitaire

Le parasite s'installe plus facilement chez l'animal sur un terrain immunodéprimé. Il est clair que la cryptosporidiose affecte les individus très jeunes, dont le système immunitaire est encore immature [73]. Et la prise du colostrum dans les premières heures de vie permet un transfert d'immunoglobulines de la mère vers le nouveau-né, le protégeant alors d'un certain nombre d'infections. Ainsi, un défaut au niveau du colostrum, en quantité et/ou en qualité, est souvent associé à des épidémies de cryptosporidiose en élevage [74].

4 Facteurs favorisants de la contamination

4.1 Chez l'oocyste

- La taille réduite des oocystes.
- Leur résistance au chlore.
- Leur caractère sporulé.
- Leur résistance dans l'environnement.
- Le réservoir de parasites, et l'excrétion massive des oocystes par les individus infectées qui assurent la contamination des ressources hydriques [69].

4.2 Chez l'hôte

- Mauvaise condition d'élevage chez les petits ruminants.
- La saison qui conduit à l'élevage intensive.
- L'âge des animaux surtout les jeunes qui plus sensible comme les agneaux et les chevreaux
- L'état de santé des animaux (excrétion des oocystes plus important en cas de diarrhée)

Chapitre III

Tableau clinique et lésionnel du parasite

1 Symptômes

La maladie s'exprime cliniquement essentiellement chez les animaux nouveau-nés. Les Agneaux peuvent être contaminés juste après la naissance. S'ils demeurent artificiellement en dehors de tout contact avec le parasite [74], ils seront, avec l'âge, toujours sensibles à l'infection mais les signes cliniques seront moins sévères.

Chez l'adulte, le développement du parasite ne s'accompagne généralement pas de symptômes. Chez les agneaux, la cryptosporidiose se manifeste par de la diarrhée d'aspect variable (muqueuse jaune pâle à aqueuse profuse) associée à de la dépression, de l'anorexie et des douleurs abdominales [75].

La diarrhée est à l'origine d'une déshydratation ; une faiblesse et une perte de poids peuvent également être observées [20]. Elle est précédée d'une phase d'abattement et d'anorexie. Cette diarrhée s'accompagne de L'excrétion d'oocystes. Elle débute 3 à 5 J après l'infection [76]. Deux autres formes cliniques de la cryptosporidiose ont été observées [77] :

Une forme sans diarrhée, mais avec émaciations progressive a été décrite dans un lot de chevreaux âges d'une semaine; elle conduit a la mort en quelques Jours. Une autre forme avec diarrhée a été observée chez des chevreaux plus âges (6 semaines), les animaux guérissent en une dizaine de jours.

Chez les sujets en âge d'être malade, le nombre de porteurs sains n'est pas connu mais Semble élève. La gravite de la diarrhée est généralement corrélée a l'intensité de l'excrétion Fécale d'ookystes. Certains sujets fortement excréteurs sont néanmoins asymptomatiques et Réciproquement [77].

En conditions expérimentales, la diarrhée peut être absente et remplacée par la Constipation [77]. Les adultes sont presque toujours asymptomatiques bien que des formes cliniques aient été Décrites à titre exceptionnel chez des chèvres adultes [77].



Figure 04: Arrière-train souillé d'un chevreau atteint de cryptosporidiose [78] Anonyme1.

2 Les lésions

Les lésions macroscopiques décrites lors de cryptosporidiose ne sont pas pathognomoniques. Les lésions macroscopiques sont peu spécifiques :

Le contenu de l'intestin est liquide. Parfois des signes d'entérite (parfois qualifiée de la catarrhale). .de distension gazeuse ou de congestion de la muqueuse sont présent. La lumière intestinale est envahie par une grande quantité de liquide. (Blanc .jaunâtre à brunâtre) et le colon est incapable de réabsorber tout ce liquide. La destruction des microvillosités entraine une réduction de la surface intestinale et donc une malabsorption et l'altération des enzymes de l'épithélium intestinal entraine une mal-digestion [79]. Une distension gazeuse ou liquidienne des intestins est observée, associée à une congestion de la muqueuse, une entérite et une colite dans certains cas [20].

Histologiquement, les principales lésions rencontrées sont une atrophie modérée à sévère des villosités, une hyperplasie des cryptes et la présence de plages de nécrose focales [20]. La lamina propria est infiltrée par des cellules mononucléaires et des granulocytes neutrophiles [80].

Dans la plupart des cas, les formes du parasite sont détectées uniquement dans l'intestin grêle. Cependant, il arrive parfois que le parasite soit mis en évidence dans des localisations inhabituelles, comme par exemple le tractus digestif et ses glandes annexes mais aussi l'utérus, le tractus respiratoire, le cœur ou les conjonctives [20].

Sur le plan histopathologique, une inflammation, une hypertrophie et une hyperplasie des glandes gastriques sont notées, en association avec un oedème de la sous-muqueuse et de la lamina propria qui présente des infiltrations cellulaires.

3 Diagnostic

3.1 Diagnostic épidémiologique et clinique

Les données épidémiologiques et cliniques permettent d'aboutir à une suspicion mais Certainement pas à une certitude. L'apparition de diarrhées plutôt sévères sur des chevreaux âges de 5 à 20 jours, au cours de la seconde moitie des mises bas est un bon signe d'appel. Cette diarrhée n'a en revanche rien qui la distingue vraiment des autres diarrhées néonatales [81].

En présence de diarrhées néonatales avec morbidité et mortalité importante, le recours aux Antibiotiques est fréquent. Chez le chevreau, les diarrhées à *Escherichia coli* sont pourtant moins fréquentes que les diarrhées virales ou a cryptosporidies. Les antibiotiques s'avèrent alors inefficaces, ce qui peut orienter le diagnostic [82].

3.2 Diagnostic différentiel

Toutes les causes nutritionnelles ou infectieuses du complexe des diarrhées néonatales des Ruminants entrent dans le diagnostic différentiel. Les agents infectieux sont nombreux également, il s'agit :

3.2.1 Bactérienne

- **Des *colibacilles***

La colibacillose proprement dite provoque une diarrhée liquide, jaunâtre et de l'hyperthermie. Au cours des 5 premiers jours de vie. Les chevreaux touches sont nombreux et plutôt dans la Seconde moitie de mises basse [83]. Le syndrome du chevreau mou,

d'origine colibacillaire, se caractérise par une grande faiblesse chez des chevreaux de 8 a 10 jours, de la diarrhée peut éventuellement s'observer [83].

- ***Salmonella***

Plusieurs caprins de tous les âges présentent de la diarrhée verdâtre ou hémorragique, ils sont Très abattus, des lésions d'entérite nécrosante, fiévreux. Des cas de morts subites peuvent survenir. La salmonellose apparait préférentiellement en fin de période de mises bas [83].

- ***Clostridium perfringens* type B, C**

Aspect enzootique, cette affection est rencontré dans un contexte d'alimentation intensive L'apparition de l'affection est brutale, Cette toxi-infection se caractérise par des symptômes d'entérite hémorragique aigue avant L'âge de trois semaines. Elle touche souvent les plus beaux chevreaux du lot. L'évolution est toujours très rapide et conduit souvent a la mort. L'affection a souvent pour origine un défaut Dans l'allaitement artificiel et concerne plusieurs animaux.

3.2.2 Virale

- **des virus (*rotavirus, coronavirus,* ...)**

Ils provoquent de la diarrhée liquide au cours de la première semaine de vie, les animaux guérissent spontanément en quelques jours, sauf en cas de surinfections. Il y a plusieurs malades et plutôt en deuxième partie des mises bas.

3.2.3 Protozoaire

- ***Giardia duodénalis***

La giardiose se manifeste classiquement par une diarrhée pâteuse, un amaigrissement et de L'abattement chez des animaux âges de 5 a 10 semaines [84].

- ***Coccidiose***

Apparait en général après 3 semaines d'âge et entraine une diarrhée noirâtre sanguinolente [23].

Tableau05: Principales causes de diarrhée néonatales chez les chevreaux et les agneaux [83].

Causes	**Âge de survenue**	**Aspects cliniques**	**Eléments épidémiologiques**
Digestive (nutritionnelle)	Tous âges	Animal généralement peu affecté, pas d'hyperthermie (mais risque de torsion mésentérique chez le chevreau)	Souvent un seul animal atteint (ou quelques uns)
Clostridies	Avant 3 semaines	Maladies grave, diarrhée parfois hémorragique, signes nerveux, mort Subite fréquente	Plusieurs animaux touchés, plutôt en fin de saison de mise bas. aspect épizootique sur animaux de tous âges

Escherichia coli(ETEC)	Avant 10 jours	Animal généralement très affecté, diarrhée jaune, déshydratation rapide	Plusieurs animaux touchés, plutôt au milieu ou en fin de saison de mise bas
Salmonella spp.	Tous âges	Animal très affecté, diarrhée verdâtre parfois hémorragiquedéshydratation rapide, mort subite possible chez les caprins	Plusieurs animaux touchés, plutôt en fin de saison de mise bas. Aspect épizootique sur animaux de tous âges
Rotavirus Coronavirus	Première semaine et jusqu'à 3 mois pour coronavirus	Diarrhée liquide, déshydratation guérison spontanée possible	Souvent un seul animal atteint (ou quelques uns)
Cryptosporidium spp.	5 jours à 3 semaines	Diarrhée jaunâtre apyrétique, déshydratation faible, apyrexie	Plusieurs animaux touchés, plutôt en fin de saison de mise bas. aspect épizootique sur animaux de tous âges

3.3 Diagnostic au laboratoire

Il repose sur la mise en évidence d'oocystes dans les matières fécales [63]. Les excréments peuvent être prélevées sur le sol ou à même le rectum [70].

Mise en évidence des oocystes

Le diagnostic fait appel à des techniques de Concentration et de coloration à partir des matières fécales. Ces techniques sont suffisantes pour le diagnostic de cryptosporidiose clinique mais pas pour des échantillons contenant un très petit nombre de parasites. Lorsqu'on recherche les porteurs sains dans un troupeau par exemple, il faut faire appel à des techniques plus sensibles comme l'immunofluorescence ou l'ELISA; des kits sont disponibles mais ces techniques sont plus coûteuses [85].

3.3.1 Les techniques de concentration

Elles ont pour but de concentrer dans un faible volume un petit nombre de parasite dispersés initialement dans un grand volume :

3.3.1.1 Techniques de sédimentation

Elle est basée sur la concentration des oocystes de *Cryptosporidium* dans le culot tout en éliminant le maximum de débris. Il est possible d'augmenter la sensibilité de cette technique en rajoutant certains produits, tels que du formol pour fixer et conserver le parasite, ou de l'éther pour éliminer des matières grasses [86].

La technique de concentration à l'acétate d'éthyle se rapproche de celle décrite précédemment et a présenté de très bons résultats avec une prise d'essai de 1 gramme de matières fécales provenant d'animaux non sevrés [84].

3.3.1.2 Techniques de flottation

Elle est basée sur la différence de densité entre le milieu liquide utilisé et les oocystes. Les oocystes remontent à la surface du liquide et sont récupérés afin d'être identifiés [86].

Il est important que ce liquide ne modifie pas la forme ou la taille des oocystes de *Cryptosporidium spp* de façon à ce qu'ils puissent être détectés par la suite [87].

3.3.2 Les techniques de coloration

Les techniques de coloration des cryptosporidies sont nombreuses : Heine, Ziehl-Neelsen modifiée, Giemsa, etc… [4,88]. Ces méthodes peuvent détecter les oocystes chez l'animal malade, mais ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter l'infection chez l'animal asymptomatique [89, 90,91].

3.3.2.1 Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée

Elle se fait grâce à la fushine de Ziehl et le vert de malachite. Les oocystes sont rouges sur un fond vert ou bleu si la contre-coloration a été réalisée par le bleu de méthylène ; Cette méthode est parfois considérée comme la technique de coloration de référence [17, 29, 92]. L'inconvénient de cette technique est qu'il est possible de confondre les oocystes avec des levures, des spores de champignons ou des bactéries [93].

Certaines structures risquent d'être confondues avec les oocystes:

- des levures, elles sont en fait plus grosses que les oocystes (6à10microns) et de couleur bleue
- des globules de graisse
- des éléments bactériens (plus petits)
- des grains d'amidons, rouges et ronds avec des cercles concentriques- des dépôts de fuchsine, rouges et sans structures internes [63,93, 94].

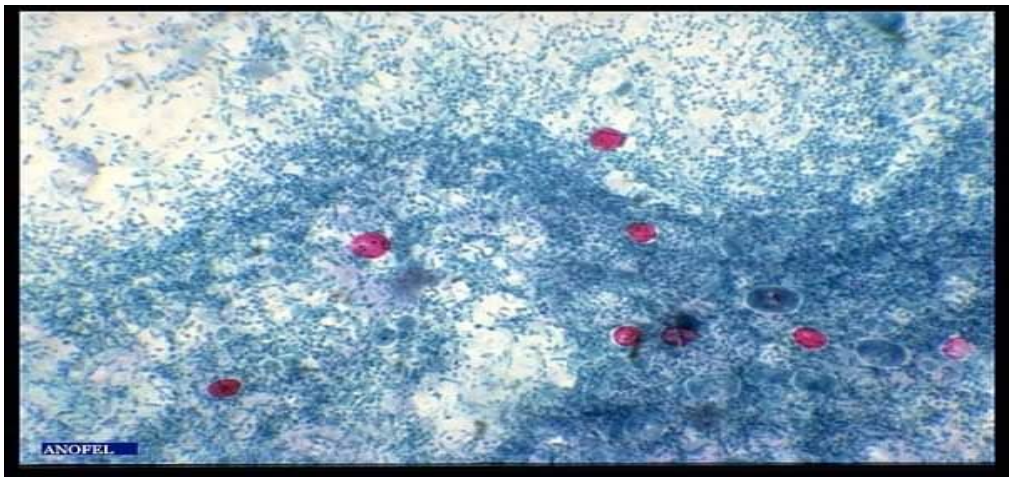


Figure 05: Oocystes de *cryptosporidium sp* dans les selles coloration Ziehl-Nielsen, *1000 [95].

3.3.2.2 Coloration de Heine

Elle commence par le mélange des fèces avec un volume égal de carbol fuschine pendant une minute. Le tout est alors étalé en frottis et séché à l'air. Il est nécessaire d'observer les lames rapidement, dans les15 minutes. Les oocystes, qui sont non colorés, sont brillants sur le fond rose .Les éléments non parasitaires apparaissent rouges [86].

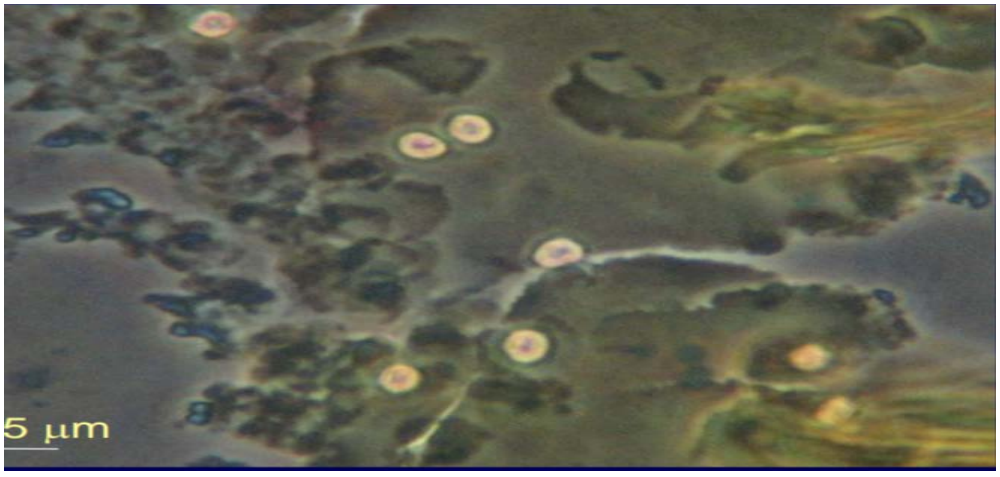


Figure 06: Oocystes de *Cryptosporidium* colorés par la technique de Heine, observés en contraste de phase (objectif 40) [96].

3.3.2.3 Coloration au Giemsa

C'est une technique facile, rapide et peu couteuse, à tendance d'être abandonnée en raison des difficultés rencontrées lors de lecture. Les cryptosporidies apparaissent avec un cytoplasme bleuté granuleux et un centre généralement plus clair contenant des corpuscules rouge foncé. Cette méthode est peu sensible car les oocystes, ne sont pas colorés [97]

La sensibilité, la spécificité ainsi que les résultats fournis par les techniques de coloration varient de façon très importance selon les laboratoires. A ce jour, la coloration «négative» au vert de malachite est la technique ayant obtenu les meilleurs résultats [75].

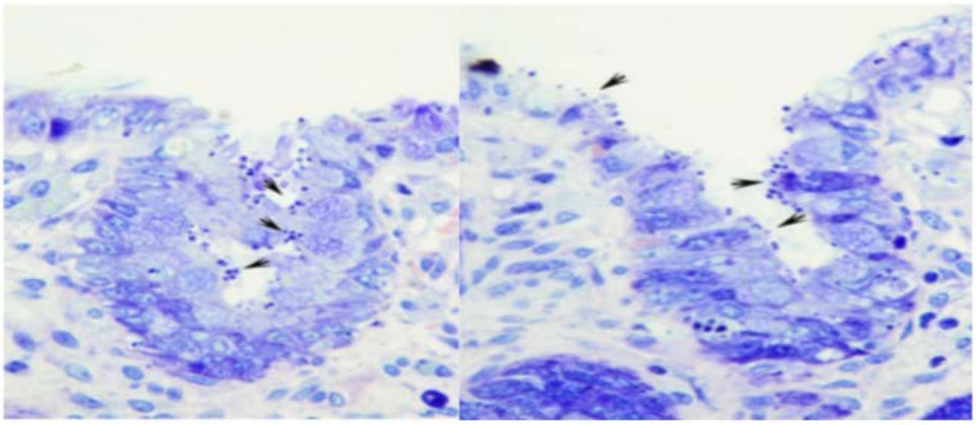


Figure07: *Cryptosporidium spp* colorée par la méthode de Giemsa [98] Anonyme2.

3.3.2.4 Coloration acide rapide de kinyoun

Cette méthode est très proche des colorations de ziehl-Nelsen modifie (par Henriksen) est rapide, sensible et très spécifique. Le temps de Décoloration s'avère être le point délicat, important à maitriser [99].

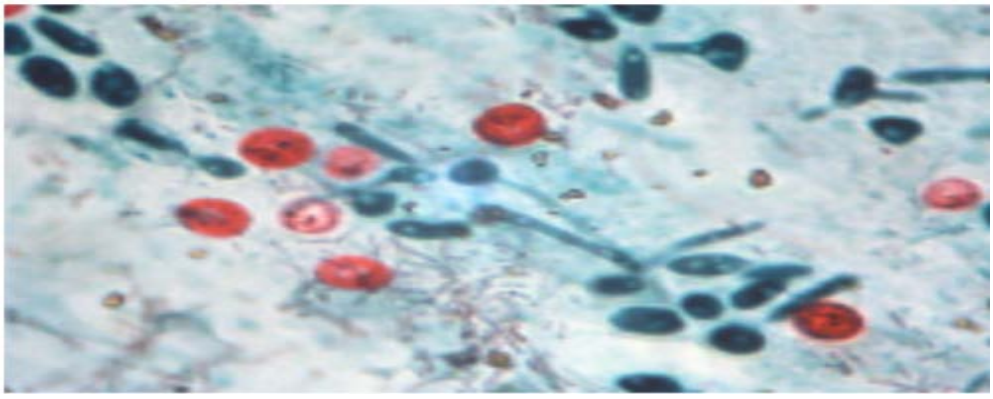


Figure08 : coloration acide rapide de kinyoun, Oocystes de C. *Parvum* sont de couleur rouge [100] Anonyme3.

3.3.2.5 Technique auramine O

Comme pour la technique de kinyoun, le temp de décoloration est délicat, assure une : lecture plus facile, touts les autres éléments des selles se trouvant décolorés.

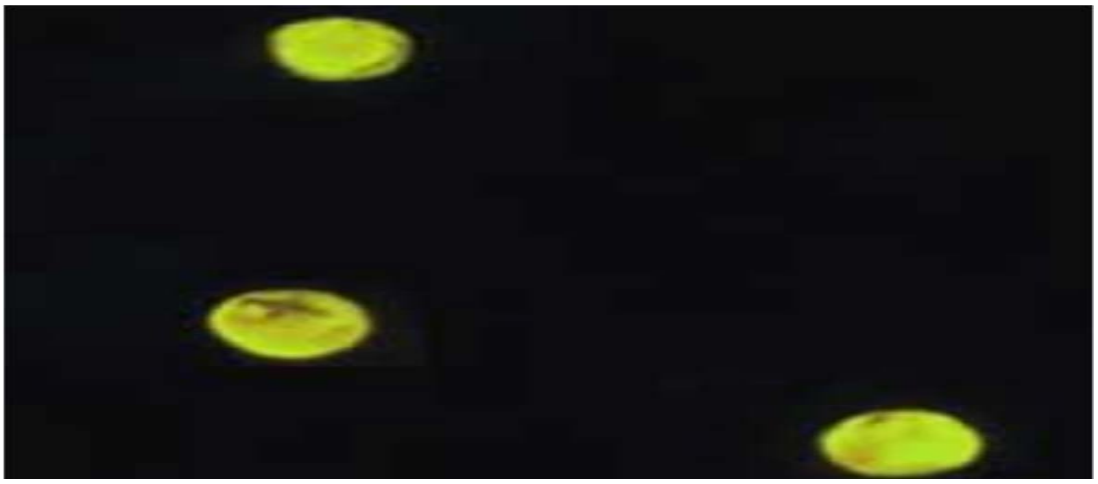


Figure09 : Coloration d'oocystes de *Cryptosporidium* à l'auramine-rhodamine [101] Anonyme4.

Tableau06 : Estimation de la qualité de la morphologie de l'oocyste *Cryptospridium* visualis par les différentes techniques de colorations [102].

Techniques	**Morphologie de l 'oocyste**
Ziehl-Nielsen modifiée par Henriksen	Excellente
Giemsa	plus au moins bonne
Heine	Moyenne

Auromine O	Mauvaise

3.3.3 Méthodes immunologiques

Plusieurs techniques immunologiques ont été développées, telles que L'agglutination de particules de latex ou l'hémagglutination passive Inversée (Reverse Passive Hemagglutination Assay), ainsi que l'utilisation d'anticorps monoclonaux et polyclonaux marqués avec des substances fluorescentes [23].

Dans la plupart des cas, ils constituent un bon outil pour détecter les oocystes, même lorsque la charge parasitaire est faible dans les échantillons, avec sensibilité et spécificité élevées [103].

3.3.3.1 Immunofluorescence directe

Certains antigènes de l'ookyste de *Cryptosporidium sp* peuvent être détectés par immunofluorescence directe en utilisant un anticorps monoclonal marqué à la fluorescéine [104,105]. Cette méthode permet d'allier une reconnaissance morphologique et immunologique d'où une meilleure spécificité et sensibilité par rapport à la microscopie optique. La limite de détection est de 104 à 105 oocystes par gramme. Il faut néanmoins faire attention aux réactions croisées et à la variabilité des antigènes à la surface de l'oocyste. Elle n'est utilisable qu'en laboratoire car elle nécessite un microscope à fluorescence [75].

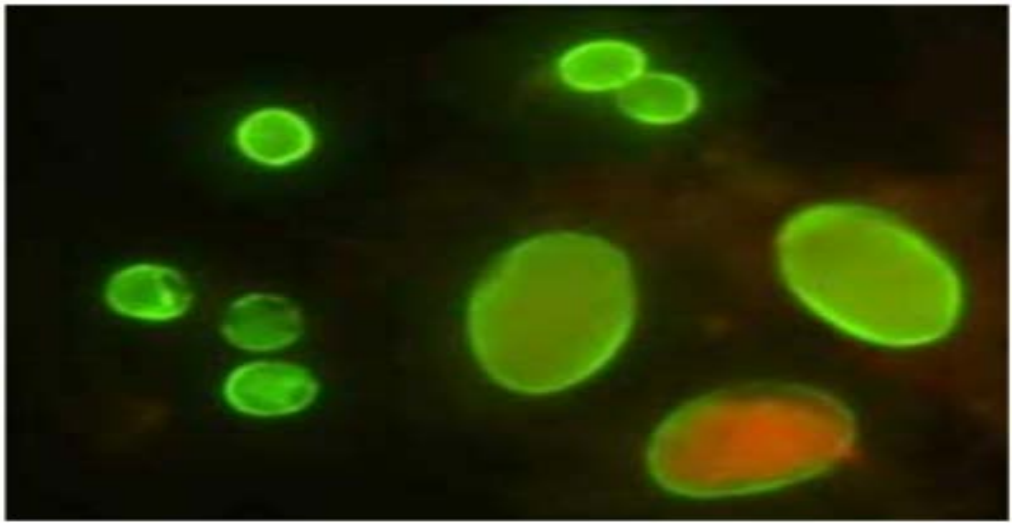


Figure 10 : Image d'oocystes de *Cryptosporidium* (en haut à gauche) révélés par des anticorps immunofluorescents [106] Anonyme5.

3.3.3.2 ELISA

Différents kits ELISA existent pour le diagnostic de *Cryptosporidium* dans les fèces. Les antigènes de surface des oocystes du parasite sont directement reconnus par des anticorps monoclonaux. La spécificité de ces tests est élevée supérieure à 99%, mais concernant la sensibilité les avis divergent [107].

3.3.3.3 Test d'agglutination au latex

Des tests d'agglutination au latex existent pour la détection des cryptosporidies. Cette méthode utilise des microsphères de latex conjuguées avec des anticorps anti-*Cryptosporidium*. Si des antigènes sont présents dans les matières fécales, les microsphères vont s'agglutiner et la densité de la suspension sera modifiée.la sensibilité et la spécificité de cette technique sont respectivement de 95,1 et 96% chez les caprins [94].

3.3.4 Cytométrie de flux

La cytométrie de flux se définit comme l'étude précise de cellules isolées entrainées par un flux liquide. L'analyse de signaux optiques ou physiques émis par les particules coupant le faisceau lumineux d'un laser permet une caractérisation individuelle, qualitative et quantitative de celles-ci. Dans le cas de la détection des oocystes de *Cryptosporidium*, le marquage de ceux-ci avec des anticorps fluorescents est effectué préalablement au passage dans le cytomètre de flux. La combinaison de ces deux méthodes permet la détection de faibles quantités d'oocystes, cependant les seuils de sensibilité et les taux de récupération des oocystes varient selon les études [108].

3.3.5 Tests immunochromatographique

Des kits de diagnostic rapide par immunochromatographie (IC) ont également été mis au point pour détecter *Cryptosporidium spp*. Il s'agit de bandelettes sur lesquelles sont fixés des anticorps dirigés contre des antigènes solubles de *Cryptosporidium spp*. Ces derniers, présents dans les matières fécales, migrent sur la membrane où sont fixés les anticorps. La liaison antigène-anticorps est révélée par une bande de couleur [109,110].

3.3.6 Biologie moléculaire

Les examens microscopiques souffrent très souvent d'un manque de sensibilité et ne permettent la mise en évidence que d'animaux cliniquement atteints et excrétant de grandes quantités d'oocystes.

- Les méthodes moléculaires, comme la PCR quantitative ou la COWP-PCR (*Cryptosporidium* oocyst wall protein PCR), présentent une alternative à la détection du parasite.

-La PCR quantitative serait la méthode la plus sensible et permettrait d'identifier les animaux dans les stades les plus précoces de la maladie [111].

-l'utilisation de telles techniques permet de déterminer le génotype mais aussi le sous-type de *Cryptosporidium* [112]. Elle utilise un fragment de l'ARN de la petite sous-unité ribosomale du parasite [113].

3.3.7 Examen histologie

Des oocystes peuvent être retrouvés dans le liquide jéjunal ou la bile et très exceptionnellement dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire. Les cryptosporidies peuvent également être mises en évidence par examen histopathologique de biopsies intestinales après coloration à l'hématoxyline. Cet examen permet de voir les parasites en cours de multiplication dans les entérocytes. Le parasitisme conduit à une altération du pole apical des entérocytes avec disparition de la bordure en brosse [95]. Cependant ces lésions, non pathognomomiques, ne permettent pas de confirmer le diagnostic de cryptosporidiose.

Dans un premier temps un prélèvement doit être réalisé de manière à avoir la jonction entre la zone saine et la zone lésée,

Fixer immédiatement pour éviter l'autolyse, utiliser du formol 10% tamponné, à raison de 10 volumes de formol pour un volume de tissu.

Les tissus prélevés doivent être sous forme de cube ayant une épaisseur de 0,5 cm et une longueur de 1 à 2 cm.

Les échantillons sont ensuite colorés à l'aide d'hématoxyline et d'éosine ou par la coloration de Giemsa. Néanmoins, l'utilisation d'un microscope électronique est souvent nécessaire pour confirmer l'identité des micro-organismes présents [20, 114,115, 116].

Ces techniques s'avèrent peu sensibles en raison de la taille des échantillons et de la distribution irrégulière du parasite dans les tissus prélevés. Etant également coûteuses et chronophages, elles ne sont pas recommandées pour un diagnostic de routine [20].

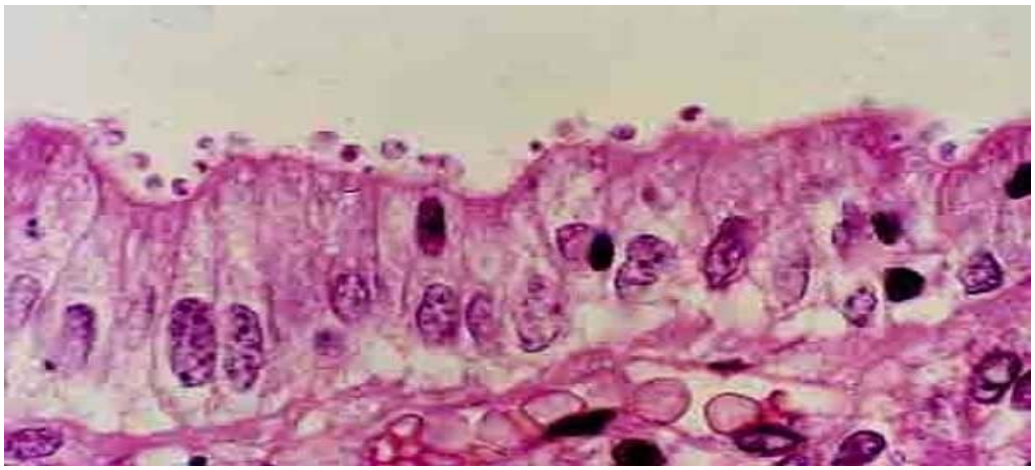


Figure 11: Cryptosporidiose intestinale. Noter la présence des parasites au pôle apical des entérocytes, *400 [95] Anonyme6.

4 Traitement

A ce jour aucun médicament ne s'est montré efficace contre la cryptosporidiose aussi bien chez l'homme que chez l'animal [10,117] cela s'explique par la double membrane recouvrant le parasite, qui le protège des médicaments libres dans l'intestin [60].

Plusieurs molécules ont été testées sur des modèles animaux et peu d'entre eux ont montré une efficacité clinique [28]. Le lactate d'halofuginone atténue les signes cliniques de diarrhée et réduit l'excrétion des oocystes et le risque de mortalité. Ce produit ne détruira pas toutes les cryptosporidies infectant l'animal, mais limitera leur multiplication [118]. Il est administré à la dose de 0,120 mg/kg/j pendant une semaine dès le premier ou le deuxième jour suivant la naissance. Dans ce contexte particulier, le traitement correctif devient donc très important :

- Fluido-thérapie orale ou intraveineuse pour combattre la déshydratation en attendant la guérison spontanée de l'animale.
- L'administration des protecteurs de muqueuses.
-L'administration des antibiotiques pour lutter contre les agents pathogènes bactériens compliquant [28].

5 Prophylaxie

Les mesures hygiéniques et sanitaires sont très importantes pour prévenir les épisodes de cryptosporidiose et reposent sur deux grands principes : la destruction des oocystes dans

l'environnement et La réduction des possibilités de contact avec les oocystes. Il faut veiller à ce que les agneaux ingèrent suffisamment de colostrum de bonne qualité à la naissance. Isoler les animaux malades des animaux sains pour réduire la transmission du parasite. Éviter les surdensités d'animaux, maintenir les lieux et les bâtiments propres. Nettoyer le matériel et désinfecter les locaux régulièrement.

Il est important de contrôler l'hygiène des litières, notamment lors de la période d'agnelage. En laissant un temps de contact de plusieurs heures. Il est ensuite conseillé de faire un vide sanitaire de 15 jours minimum. La désinfection des sols, des murs jusqu'à un mètre de haut et tout le matériel en contact avec les animaux, permet de réduire la pression d'infection du milieu extérieur mais n'empêche pas la récontamination via les animaux porteurs asymptomatiques [55].

Matériels et Méthodes

1 Objectif

L'objectif de notre travaille c'est la recherche de *Cryptosporidium sp* dans des prélèvements de matières fécales des caprins sans prendre en considération le sexe ni l'âge de l'animal afin de déterminer la prévalence de cette maladie dans la wilaya de Médéa.
Aussi la réalisation des coupes histologiques pour confirmé la présence de parasite au niveau de l'intestin.

2 Région et période d'étude

L'étude est réalisée sur le territoire de différentes communes de la wilaya de Médéa (Beni Sliman ,Mihoub, Azizia, Maghraoua, Tablet).Elle s'étale de début de mois du janvier jusqu'au mois de juin.
Le stage a été réalisé au niveau de structure scientifique : Le laboratoire du projet de fin d'étude de l'université de Médéa.

3 Matériels et méthodes

3.1 Analyse coprologique

Matériel biologique

90 échantillons recueillis à partir des élevages caprins repartis dans les régions Suivantes : Beni Sliman ,Mihoub, Azizia, Maghraoua,Tablet.



Figure12 : exemple d'élevages caprins

Matériel de prélèvement

- ✓ Un récipient isotherme pour la conservation des prélèvements.
- ✓ Un frigo pour la conservation des prélèvements à 4°C.
- ✓ Des gants.
- ✓ Des pots en plastiques stériles.
- ✓ Etiquettes autocollantes pour écrire les renseignements

Matériel d'analyse de laboratoire

- ✓ Spatule.
- ✓ Tubes coniques.
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Pipette Pasteur.
- ✓ Lames bien dégraissées.
- ✓ Lamelles.
- ✓ Portoirs.
- ✓ Pinces.
- ✓ Eau de robinet.

- ✓ Microscope optique.
- ✓ Huile à émersion.

Réactifs et colorants

- ✓ L'eau distillée.
- ✓ L'eau robinet.
- ✓ Eau formolé à 10% : 90 ml d'eau distillée + 10 ml formol.
- ✓ Méthanol pur.
- ✓ Fuchsine phéniquée : (1g de fuchsine +100ml d'eau distillée).
  (10ml d'alcool absolu+90 ml d'eau distillé).
- ✓ Ether diéthylique.
- ✓ Vert malachite à 5% : 5g vert malachite + 100 ml eau distillée.
- ✓ Acide sulfurique à 2% : 2ml d'acide sulfurique + 98 ml d'eau distillée

Méthodes

Prélèvement

On a récolté des échantillons de la matière fécale de l'ensemble des animaux de chaque élevage. Dans cette étude, les caprins ayant servis à l'étude sont de toute tranche d'âge et sans distinction de sexe. Chaque animal a fait l'objet d'un seul prélèvement directement à partir du rectum ou juste après leur émission dans des pots en plastiques stériles et étiquetés.
Chaque étiquète a été remplie pour chaque animal concernant :

- ✓ Age de l'animal
- ✓ Sexe de l'animal.
- ✓ Lieu du prélèvement.
- ✓ Date du prélèvement.

Ces prélèvements ont été acheminés au laboratoire, en respectant la chaine de froid à l'aide d'un récipient isotherme à la température de 4 °C jusqu'à leur analyse.



Figure13：Exemple de boites à prélèvements.

Deux techniques ont été utilisées :

Technique de concentration de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley (119,120) : Cette technique est appliquée systématiquement pour tous les prélèvements de la matière fécale qui ont récoltés dans notre étude. Elle est utilisée pour la concentration des éléments parasitaires dans un prélèvement donné.

- **Mode opératoire:**

1- Préparer la solution de Ritchie à 10% : 10ml d'eau formolée avec 90ml d'eau distillée

2- Déposer quelques grammes de selles dans un tube à fon conique à l'aide d'une spatule.



Figure14 : Déposer quelques grammes des selles dans un tube conique.

3- Verser dans le tube à pied un volume d'eau formolée à 10%, 2 à 3 fois supérieur à celui des selles.



Figure 15 : Verser l'eau formolée dans le tube.

4- Agiter le tout à l'aide d'un agitateur, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.



Figure16 : agitation à l'aide d'un agitateur.

5- Laisser décanter quelque minute pour l'obtention d'un surnageant dépourvu de débris.



Figure 17 : décantation quelque minute.

6- A l'aide d'une pipette pasteur aspirer une quantité de surnageant dans les 2/3 du volume dans un tube de centrifugation à fon conique.



Figure18 : aspirer une partie du surnageant.

7- Ajouter un volume d'Ether équivalent au 1/3 du volume total de tube.

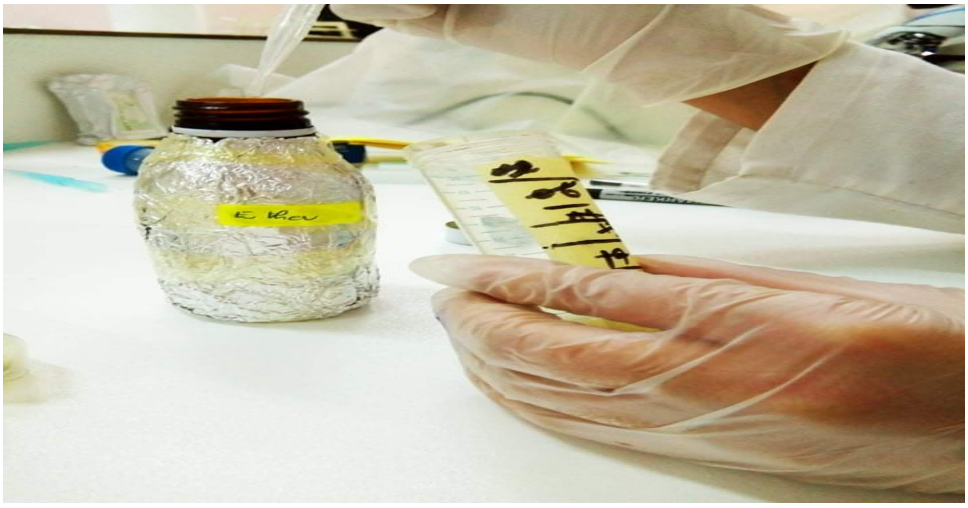


Figure19 : Ajouter un volume d'éther.

8- Boucher le tube avec le doigt ganté et agiter vigoureusement pendant 1min.

9- Peser les tubes pour l'équilibrage avant centrifugation.

10- Centrifuger à 2500 tour / minutes pendant 5 minutes.



Figure20 : Centrifugation des tubes

- Après la centrifugation, on obtient dans le tube 4 couches qui sont du haut vers le bas :

-Une couche d'éther de couleur jaune constituée de graisse.

-Un anneau constitué de gros débris.

-Une couche aqueuse.

-Un culot dans lequel sont concentrés les éléments parasitaires.

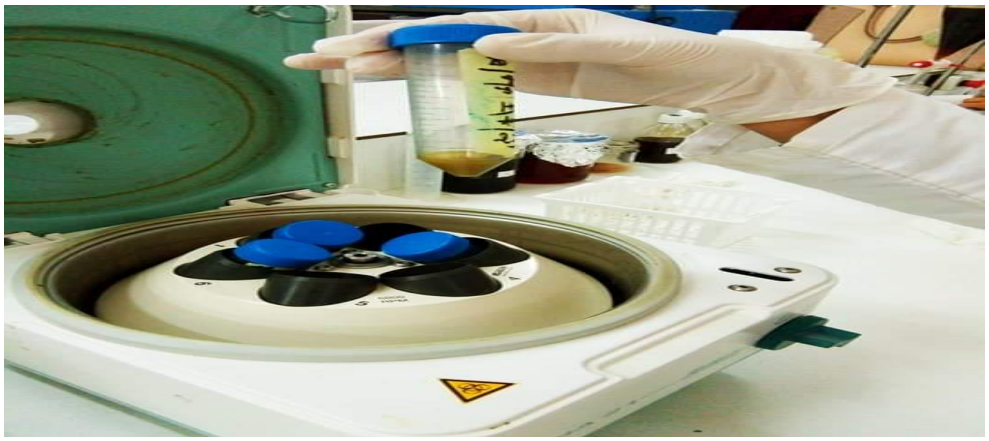


Figure21 : Tube se répartit en 4 couches.

11- Jeter énergiquement le surnageant et garder le culot.

12- A l'aide d'une pipette pasteur, on mélange bien le culot, et on aspire quelques gouttes et le déposé sur une lame bien digressé.



Figure22 : aspirer le culot et déposé sur la lame.

Technique de Zielhl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz

C'est une technique spécifique pour la coloration des oocystes de *Cryptosporidium sp.*

Confection du frottis : On dépose sur une lame bien dégraissée à l'aide de pipette pasteur, une goutte du culot de centrifugation obtenu par la technique de concentration de Ritchie citée si dessus. A l'aide d'une autre lame, confectionner le frottis.



Figure23 : étalement de frottis.

2- Laisser le frottis sécher à l'air.

3- Fixation du frottis par du méthanol pendant 5 minutes.

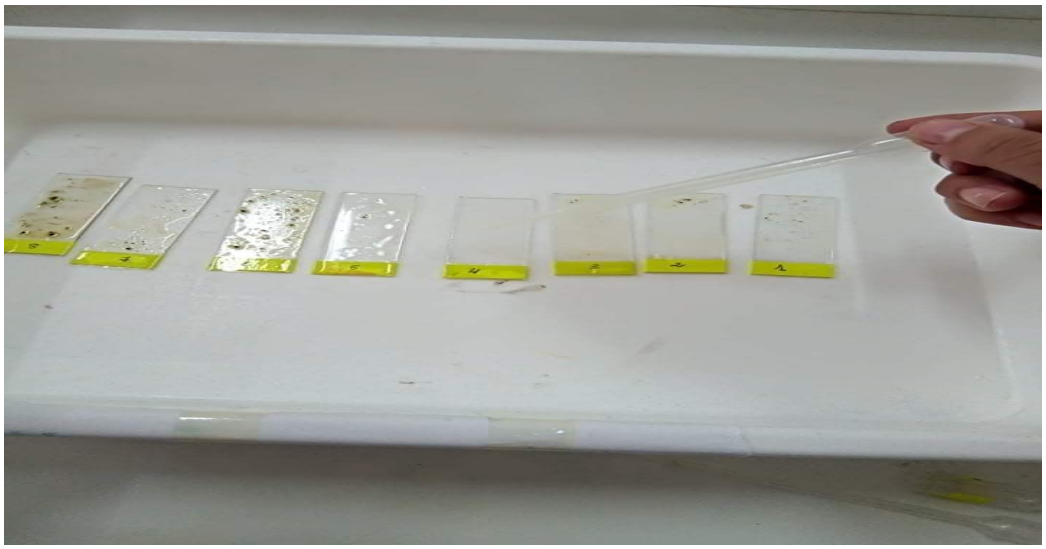


Figure24 : Fixation le frottis par méthanol.

4- Sécher de nouveau.

5- Colorer la lame dans un bain de fuchsine phéniquée pendant 1 heure.

6- Rinçage sous l'eau du robinet.

7- Différencier avec l'acide sulfurique à 2 % pendant 20 secondes.

8- Rincer sous eau du robinet.

9- Contre coloration avec une solution de vert de malachite à 5% pendant 5 minutes.

10- Rinçage de nouveau.

11- Séchage à l'air jusqu' a l'observation au microscope optique.

La Lecture

La lecture du frottis coloré se fait au microscope optique au grossissement ×40 puis ×100 (avec l'huile à émersion).
Le diagnostic est dit positif, quand les oocystes de *Cryptosporidium sp*. Apparaissent en rouge-vif sur un fond vert (vert malachite), ils se présentent sous forme d'éléments arrondis de 2 à 6 µm de diamètre et renfermant de grosses granulations noirâtres [121]. Il est dit négatif quand aucun oocyste n'est visualisé après observation de 100 champs microscopiques [122].

3.2 La Coupe histologique
Matériels

- ✓ Lame
- ✓ Lamelle
- ✓ Cuve à coloration
- ✓ Microtome
- ✓ Microscope
- ✓ Pissette d'eau distillée
- ✓ Plateau émaillé

Réactifs :

- ✓ Formol
- ✓ Alcool
- ✓ Eau distillée
- ✓ Toluène
- ✓ Paraffine
- ✓ Colorant (l'hématoxyline-éosine).
- ✓ Baume de canada

Mode opératoire [123]

Prélèvement

- Un fragment d'organe doit être prélevé sur un cadavre de caprin, on parle l'échantillon de tissu de biopsie intestinale.

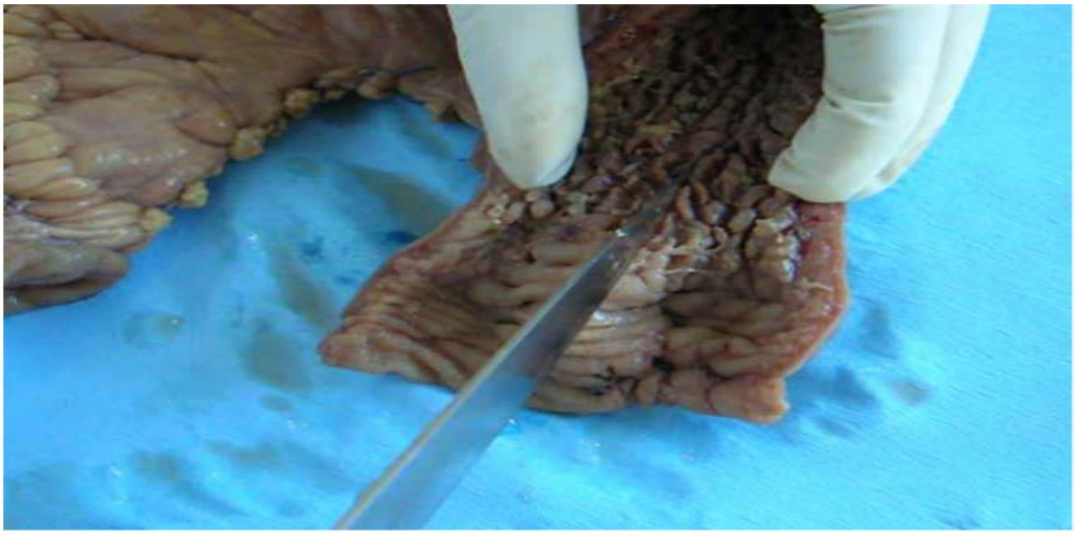


Figure25 : prélèvement d'un fragment de tissu (biopsie intestinale)

- Afin de conserver les tissus prélevés dans un état proche du vivant, le prélèvement doit être immergé dans un grand volume de liquide fixateur.
- Les prélèvements reçus sont analysés macroscopiquement.

Fixation

- Mettre la pièce anatomique dans un bain de formol à 10% entre 24h et48h.

- Il faut veiller à préparer un bain qui représente 10 fois la masse de la pièce à fixer.



Figure26 : fixation de pièce dans un bain de formol

- Le fragment doit être positionné dans une cassette que l'on ferme et que l'on trempera dans les bains successifs.

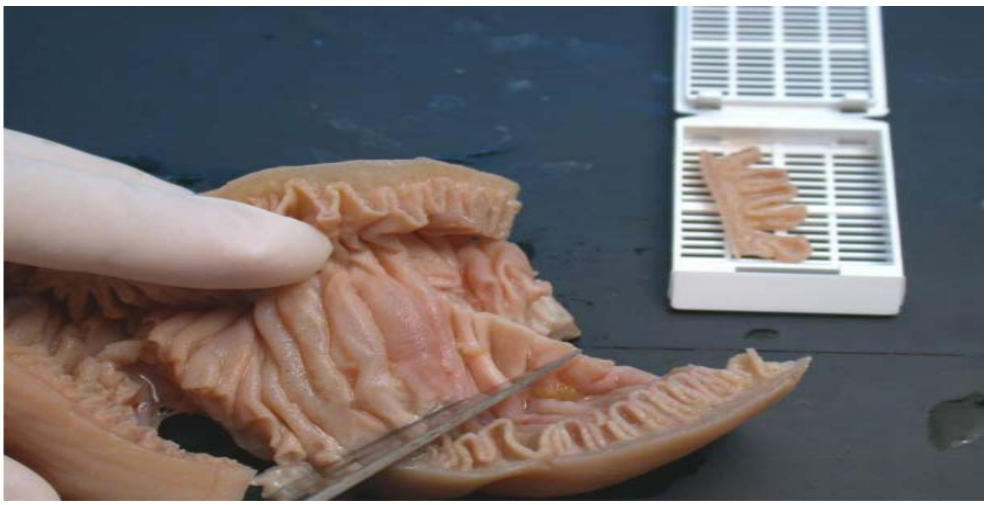


Figure27 : placer les fragments dans des cassettes.

Déshydratation

- Mettre dans des bains successifs d'alcools de concentration croissante pour déshydrater l'organe sachant que la paraffine est très hydrophobe.

- Ensuite mettre dans 3 bains successifs de **toluène** de concentration identique pour éliminer les traces d'alcool. Le prélèvement devient transparent, c'est la clarification.



Figure28 : bains de déshydratation (automate).

Inclusion /enrobage

- Pour but de permettre la réalisation des coupes fines(2à5 µm) les prélèvements sont plongés dans des moules de paraffine fondue qui occupera tous les espaces vides dans le tissu.
- On place l'inclusion au congélateur pour faciliter le démoulage.

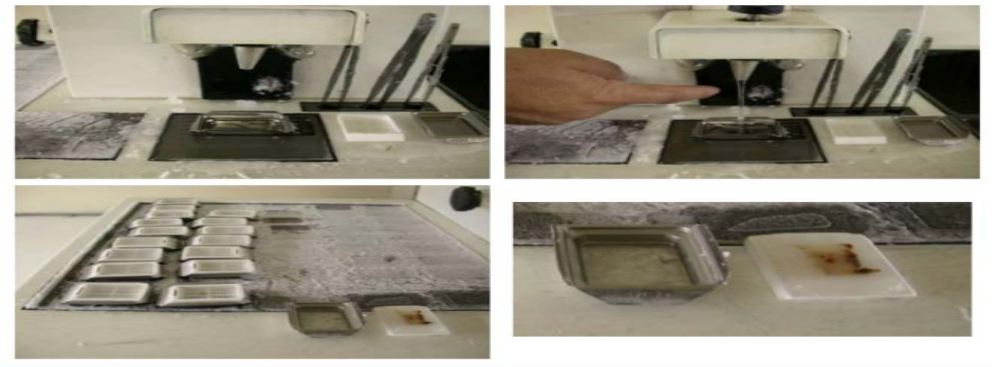


Figure29 : inclusion des fragments dans les moules de paraffine

Préparation de Coupe

Le microtome

- placer le bloc de paraffine dans le microtome pour réaliser des sections de 2 à 5 µm disposées en séries régulières sous forme d'un ruban.



Figure 30: réalisation de sections de ruban.

Confection des coupes histologiques

- étalement des segments de ruban de paraffine sur une lame contenant l'eau albumineuse (un liquide d'étalement).

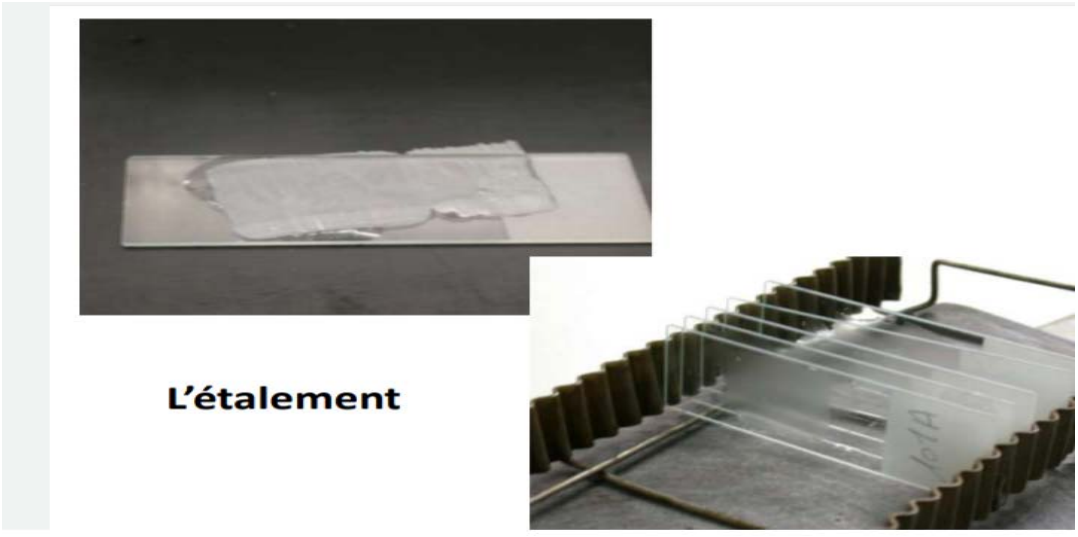
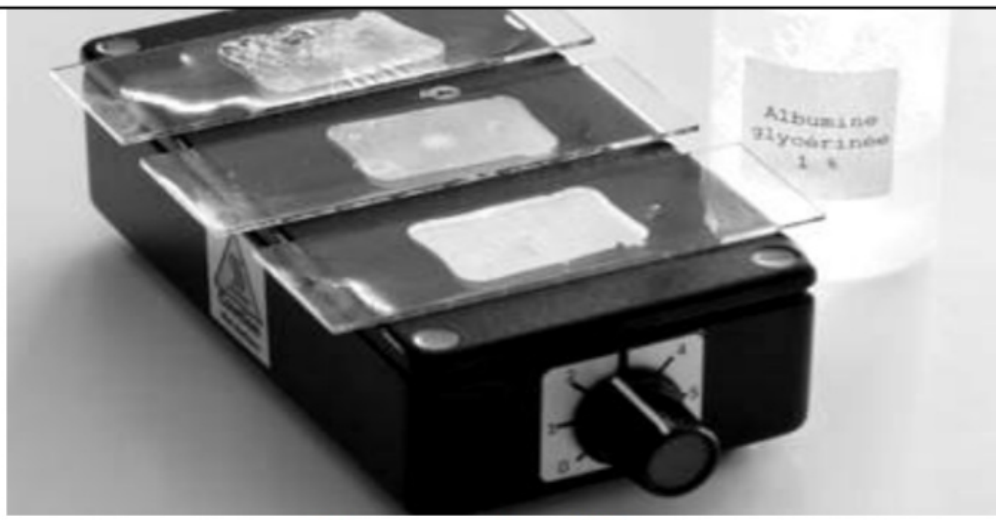


Figure 31: étalement des segments sur les lames.

- Collage des lames qui sont placées sur une plaque chauffante à 50ºc.



Plaque chauffante

Figure32 : placer les lames sur une plaque chauffante

Déparaffinage

- Placer les lames dans 2 bains de toluène pendant 2 min, pour éliminer le paraffine.

Réhydratation

- Immerger les lames dans des bains d'alcools de degrés décroissant. (2 min pour chaque bain)
- puis placer les lames dans un bain d'eau distillé.

Coloration à hématoxyline-éosine

- Bain à l'hématoxyline, permet de colorer les noyaux pendant 5 min.
- Rinçage eau du robinet.
- Rinçage eau distillée.
- Bain à l'éosine, permet de colorer le cytoplasme en rose.
- Rinçage eau distillée.
- Bain dans l'alcool à 95% pendant 1min.
- Bain dans l'alcool à 100% pendant 1min.

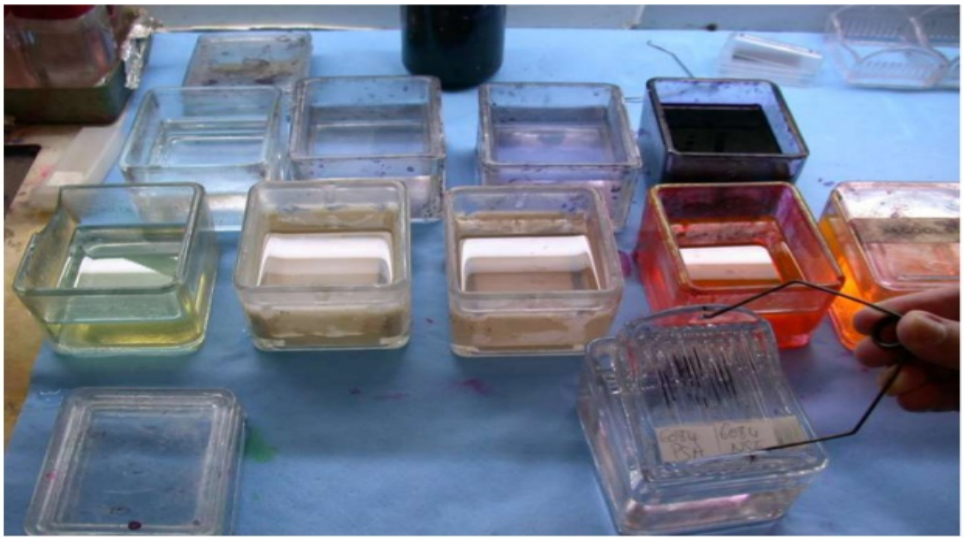


Figure33 : coloration des lames.

Montage et observation microscopique

- on dépose une goutte de baume de canada sur la lame.
- avec une pince on fixe la lamelle soigneusement.

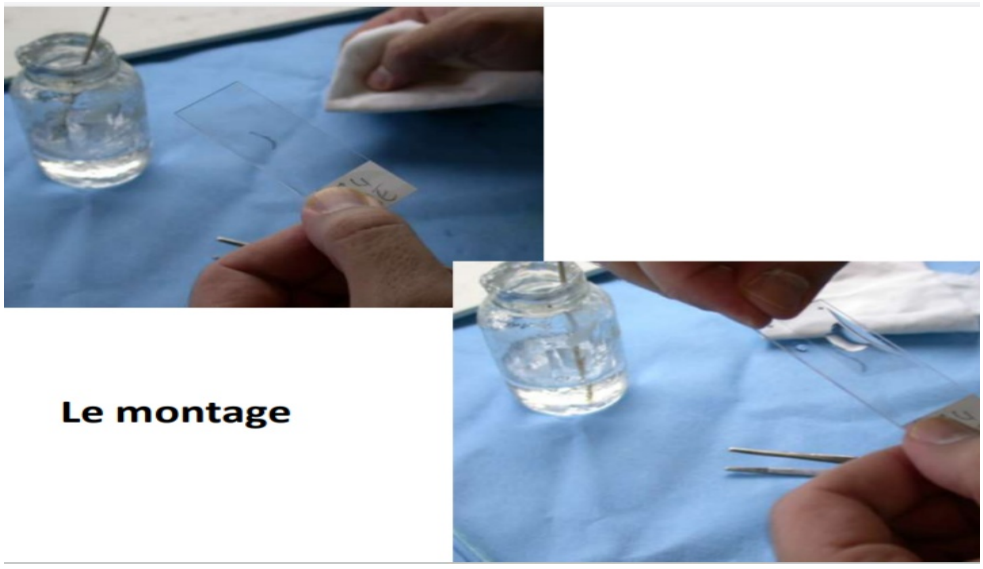


Figure34 : montage des lames par une goutte de baume de canada.

- la lecture des lames se fait à faible grossissement.

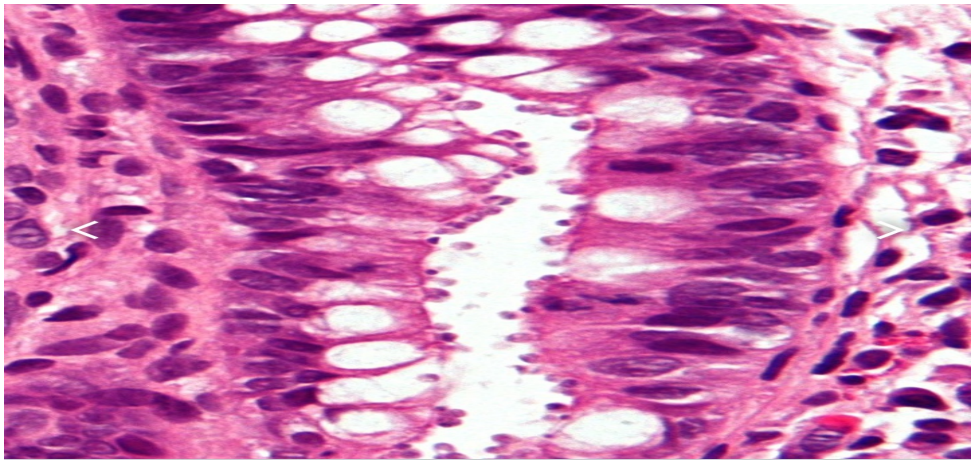


Figure35 : les cryptosoridium au microscope optique [124] Anonyme 7.

Conclusion

Notre étude a permis de connaitre l'importance de Cryptosporisidiose à l'échèle cheptel chezLes caprins.

Nous pouvons conclure à lumière de nos études bibliographiques que la Cryptosporidiose est donc une maladie aux répercussions importantes, elle est responsable de pertes économiques Importantes (mortalité élevé) car elle engendre des diarrhées, des retards de croissance voire des morts des jeunes ruminants même les adulte mâle ou femelle, mais il existe aussi une forme asymptomatique de portage (source de contamination). De plus, la grande résistance des oocystes dans le milieu extérieur (sporulation in situ) et leur caractère auto-infectieux expose les animaux à un risque élevé de contamination et l'absence de traitement curatif efficace à 100% contre cette zoonose, même si des traitements à visée prophylactique opérants sont actuellement disponibles, rend difficile la lutte contre cette maladie.

En conséquence ces animaux peuvent être un réservoir potentiel des infections humaines suite à une contamination de l'eau et du sol. De nombreux éléments restent encore à découvrir dans cette pathologie, chez les caprins particulièrement : les facteurs de risque, l'association avec d'autres entéropathogènes, et le statut de l'espèce zoonotique (C. *parvum*), d'origine caprine. Des études moléculaires pourraient être d'un grand utility.

Références bibliographique

[1]. Appelbee A.J., Thompson R.C.A, Olson M.E., (2005):giardia and cryptosporidium in mammalian wildlife-current status& future needs, trends in parasit, 21(8), 370-376.

[2]. Hélène, Christine Michèle R., 2006. La cryptosporidiose du chevreau, données bibliographiques et essai thérapeutique de la nitazoxanide. Thèse de doctorat vétérinaire. ENV d'alfort. p, 9.

[3]. TYZZER., E. 1907. A sporozoan found in the peptic gland of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 5, 12.

[4]. Tyzzer E.E., 1910. An extracellular coccidium, Cryptosporidium muris (ge. Etsp.nov.) of the gastric gland of the common mouse. J. Med. Res. 23, 487-509.

[5]. Tyzzer, E.E., 1912. Cryptosporidium parvum (sp. Nov), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch Protisenkd 26.

[6]. Slavin, D., 1955. Cryptosporidium meleagridis (sp.nov.) J. Comp. Pathol. 65, 262-266

[7]. Panciera, R.J., Thomassen, R.W., Garner, F.M., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. Vet. Patho. 8, 479-484.

[8]. Meisel, J .L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a cryptosporidium in an immunosuppressed patient. Gastroenterology. 70, 1156-1160.

[9]. Bonnin, A., Camerlynck, P. (1989). Cryptosporidiose humaine. Aspects épidémiologiques et cliniques. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *19*(1), 35-41.

[10]. Naciri, M. (1992). La cryptosporidiose. Importance de la contamination de l'eau. *INRA productions animales*, *5*(5), 319-327.

[11]. Ambroise-Thomas, P., Pinel, C., et Grillot, R. (1999). La cryptosporidiose humaine : une parasitose émergente d'importance croissante en santé publique. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*,72, 91-99.

[12]. Fayer, R. (2004). Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, *126*(1-2), 37-56.

[13]. Azzam - bouchek. (1992). Premiers cas de cryptosporidiose humaine rapportés en Algérie. *Publies Dans Le Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique*, 167-170.

[14]. DIAZ P, QUILEZ J, ROBINSON G, CHALMERS RM, DIEZ- BANOS P, MORRONDO P (2010). Identification of Cryptosporidium xiaoi in diarrhoeic goat kids (Capra hircus) in Spain. Vet. Parasitol., 172, 132-134.

[15]. TZIPORI, S., GRIFFITHS, J.K. . - Natural history and biology of Cryptosporidium parvum.- Advances in Parasitology, 1998, 40, 5-36.

[16]. Xiao, L., Ryan, U. M., 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Curr. Opin. Infect. Dis.17, 483-490.

[17]. Fayer, R., Xiao, L., 2007. Cryptosporidium and cryptosporidiosis. second ed. CRC Press, Boca Raton.

[18]. Slapeta, J., 2011. Naming of Cryptosporidium pestis is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as C. parvum 'bovine genotype'. Vet. Parasitol. 177, 1-5.

[19]. Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology 141, 1667–1685.

[20]. O'DONOGHUE, P.- Cryptosporidium and cryptosporidiosis in Man and Animals.- International Journal for Parasitology, 1995, **25**, 2 , 139-95.

[21]. XIAO, L., MORGAN, U.M., FAYER, R., THOMPSON, R.C., LAL, A.A. .- *Cryptosporidium* systematics and implications for public health.- *Parasitology Today*, 2000, **16**, 7, 287-92.

[22]. MORGAN, U.M., XIAO, L., FAYER, R., LAL, A.A., THOMPSON, R.C.A. .- Variation in *Crypstosporidium* : towards a taxonomic revision of the genus.-*International Journal for Parasitology*, 1999, 29, 1733-51.

[23]. **FAYER, R., MORGAN, U.M., UPTON, S.** .- Epidemiology of *Cryptosporidium* : transmission, detection and identification.- International Journal for Parasitology, 2000, **30**, 1305-22.

[24]. XIAO, L., MORGAN, U.M., FAYER, R., THOMPSON, R.C., LAL, A.A. . – Cryptosporidium

[25]. Smith, H.V., 1990. Environmental aspects of *Cryptosporidium* species: a review. Journal of the Royal Society of Medicine, 83 (10), 629–631.

[26]. JENKINS MB, EAGLESHAM BS, ANTHONY LC, KACHLANY SC, BOWMAN DD, GHIORSE WC (2010). Significance of Wall Structure, Macromolecular Composition, and Surface Polymers to the Survival and Transport of Cryptosporidium parvum Oocysts. Appl. Environ. Microbiol., 76, 1926-1934.

[27]. MATTEWS J., (1991), *Diseases of the goat,* Oxford : Butterworth-Heinemann, 310 p.

[28]. Villeneuve, A. (2003). Les zoonoses parasitaires, l'infection chez les animaux et chez l'homme. Les Presses de l'Université de Montréal.28-50. Canada.

[29]. Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R.A., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Vet Parasitol 149, 29-40.

[30]. Valigurova, A., Jirku, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modry, D., Slapeta, J., 2008.Cryptosporidia: parasites embraced by the host cell membrane. Int J Parasitol 38, 913-922.

[31]. Fayer, R., et Ungar, B. L. P. (1986). Cryptosporidium Spp. And Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews, 50*(4), 458-483.

[32]. Current, W.L., Garcia, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. Clin Lab Med 11, 873-897.

[33]. AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2002). Rapport sur les « infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau » : « Évaluation scientifique des risques associés à Cryptosporidium sp », -185p.

[34]. Barwick, R.S., Mohammed, H.O., White, M.E., Bryant, R.B., 2003. Factors associated with the likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in soil from dairy farms. Journal of Dairy Science, 86, 784-791.

[35]. KING BJ, MONIS PT (2006). Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology*, **134**, 309-323.

[36]. Harp, J.A., Fayer, R., Pesch, B.A., and Jackson, G.J., 1996. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied and environmental microbiology*, 62 (8), 2866–2868.

[37]. Roberts, C.W. and Alexander, J., 1992. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*, 104 Pt 1, 19–23..

[38]. Liang, Z., Keeley, A., 2012. Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. Water Research,46, 5941– 5953.

[39]. OMS, 2013. La charge mondiale de la toxoplasmose: une étude systématique. http://www.who.int/bulletin/volumes/91/7/12-111732-ab/fr/index.html, 91, 465–544.

[40]. Okhuysen P. C., Chappell C. L. 2002. «Cryptosporidium virulence determinants - arewe there yet? » Int J Parasitol 32:517-525.

[41). Certad G.(2008) « De la caractérisation génétique et phénotypique de Cryptosporidium (Alveo-lata : Apicomplexa) à la mise en évidence du rôle de C. pa rvum dans l'induction de néoplasie digestive.» Life Sciences. Université du Droit et de la Santé -Lille II, French.

[42]. Riggs M.W., Stone A.L., Yount P.A., Langer R.C., Arrowood M.J., Bentley D.L.,(1997) «Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of Cryptosporidium parvum sporozoites and merozoites.» J Immunol 158, 1787-1795.

[43). Cevallos A.M., Zhang X., Waldor M.K., Jaison S., Zhou X., Tzipori S., Neutra M.R., Ward H.D.,(2000) «Molecular cloning and expression of a gene encoding Cryptosporidium parvum glycoprotei ns gp40 and gp15.» Infect Immun 68, 4108- 4116.

[44]. Spano F., Putignani L., Guida S., Crisanti A., (1998) «Cryptosporidium parvum: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of Cryptosporidium-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. » Exp Parasitol 90, 195-198.

[45]. Nesterenko M.V., Woods K., Upton S.J.,(1999) «Receptor/ligand interactions between Cryptosporidium parvum and the surface of the host cell. » Biochim Biophys Acta 1454,165-173.

[46]. Riggs M.W., McNeil M.R., Perryman L.E., Stone A.L., Scherman M.S., O'Connor R.M.(1999) «Cryptosporidium parvum sporozoite pellicle antigen recognized by a neutralizing monoclonal antibody is a beta-mannosylated glycolipid.» Infect Immun67, 1317-1322.

[47]. Okhuysen P. C., Chappell C. L. 2002. «Cryptosporidium virulence determinants - arewe there yet? » Int J Parasitol 32:517-525.

[48]. Adams R.B., Guerrant R.L., Zu S., Fang G., Roche J.K.(1994). «Cryptosporidium parvum infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an in vitro model. »J Infect Dis 169, 170-177.

[49]. Steele, M.I., Kuhls, T.L., Nida, K., Meka, C.S., Halabi, I.M., Mosier, D.A., Elliott, W., Crawford, D.L., Greenfield, R.A.,1995. «A Cryptosporidium parvum genomic region encoding hemolytic activity. » Infect Immun 63, 3840-3845.

[50]. Chen, X.M., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F.,1999. «Cryptosporidium parvum induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. »Am J Physiol 277, G599- 608.

[51]. Mele R., Gomez Morales M.A., Tosini F., Pozio E.,2004. «Cryptosporidium parvum at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. » Infect Immun 72, 6061-6067.

[52]. WYATT CR, RIGGS MW, FAYER R(2010). Cryptosporidiosis in neonatal calves. Vet. Clin. Food Anim., 26, 89-103.

[53]. Soave R. Protozooses et helminthiases, cryptosporidioseChapitre 379, p: 1910.2eme édition. 2006.

[54]. andro-786.pdf.

[55). PARAUD C, CHARTIER C (2012). Cryptosporidiosis in small ruminants. Small Ruminant Res., 103, 93-97.

[56]. Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Certad, G., Le Fichoux, Y., Chartier ,C., Verdier, R.I., Cailliez, J.C., Camus, D., Dei-Cas, E., Bañuls, A.L., 2006. Cryptosporidium population genetics: evidence of clonality in isolates from France and Haiti. J. Eukaryot. Microbiol. 53 Suppl 1:S33-6.

[57]. Geurden, T., Thomas, P., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E.,2008 a. Prevalence and molecular characterisation of Cryptosporidium and Giardia in lambs and goat kids in Belgium. Vet. Parasitol. 155, 142-145.

[58]. Díaz, P., Quílez, J., Robinson, G., Chalmers, R.M., Díez-Baños, P., Morrondo, P., 2010 a. Identification of Cryptosporidium xiaoi in diarrhoeic goat kids (Capra hircus) in Spain. Vet. Parasitol. 172, 132-134.

[59]. Sonia Lacroix-Lamande., 2001. Rôle de l'interféron gamma dans la réponse immunitaire mucosale à l'infection par cryptosporidium parvum chez la souris.

[60]. Daignault, P. A. (2007). Ce qu'il faut savoir de la cryptosporidiose. Médecine Vétérinaire.44-45.

[61]. Moore, D.A., Atwill, E.R., Kirk, J.H., Brahmbahatt, D., Alonso, L.H., Hou, L., Singer, M.D., Miller, T.D., 2003. Prophylactic use of decoquinate for infections with Cryptosporidium parvum in experimentally challenged neonatal calves. J of the Am. Vet. Med. Ass. 223, 839-845.

[62]. Zambriski, J.A., Nydam, D.V., Wilcox, Z.J., Bowman, D.D., Mohammed, H.O., Liotta, J.L.,2013.Cryptosporidium parvum: Determination of ID50 and the dose-response relationship in experimentally challenged dairy calves. Vet. Parasitol. http://dx.doi.org/10.1016/J.vet.par.2013.04.022.

[63]. Chambon M (1990) : la cryptosporidiose du chevreau enquête et essai thérapeutique. thés.Méd.vét.Nantes .145 P.

[64]. Noordeen F, Horadagoda N.U., Faizal A.C., Rajapakse R.P, Razak.

[65]. **Mourin M.et al., 1978**.Neonatalcolf diarrhea:pathology and microbiology of spontaneous cases in dairy herds and incidence of the enteropathogens implicated as ethiologicalagents.porc .Second intern. Symposium on neonatal diarrhea, University of Saskatchewan, Canada, P.347-370.

[66]. Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S., 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes. Infect. 6, 773-785.

[67]. Ortega.Mora LM, Troncoso JM, Rojo. Vazquez FA, Gomez. Bautista M.,(Serum antibody reponse in lambs naturally and experimentally infected with Cryptosporidium). Vet Parasitol,(1993),50:45.54.

[68]. Blewett DA, Wright SE, Casemore DP, Booth NZ, Jones CE.,(Infective dose size studies on Cryptosporidium parvum using gnotobiotic lambs). WatSci Tech, (1993), 27:61.4.

[69]. Salven (1955) cryptosporidium meleagridis.sp.nov .j.comp.path,65:262-26.

[70]. PARAUD C, PORS I, CHARTIER C (2010). Evaluation of oral tilmicosin efficacy against severe cryptosporidiosis in neonatal kids under field conditions. Vet. Parasitol., 170, 149–152.

[71]. CHARTIERC.,(2001),Epidémiologie de la cryptosporidiose Le pointvétérinairen°212, 2-6.

[72]. Manent- Manent, M. (2014). Moyens De Lutte Thérapeutique Contre La Cryptosporidiose : Actualités Et Perspectives (Thèse Pour Le Doctorat Vétérinaire). École Nationale Vétérinaire D'alfort.

[73]. Naciri M; LZd y M.P Mancassola R., Poirier P., Chermette R(1999): role of crytposporidium parvumin neonatal diarrhea complex in suckling and dairy calves in France. Veterinary Parasitology, 85. P. 245-247.

[74]. ANDERSON BC (1998). Cryptosporidiosis in Bovine and Human Health. J. Dairy Sci., 81 (11),3036 3041.

[75]. THOMPSON RC, PALMER CS, O'HANDLEY R (2008). The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals. Vet. J., **177**, 18-25.

[76]. Chambon F., <<La cryptosporidiose du cheveau enquete et essai thérapeutique >>, Thés. Méd. Vét.,

[77]. CHARTIER C. (2002b) La coccidiose des petits ruminants, Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine, 112-117.

[78]. **Anonyme1** : GHECHAM sur le site internet VETOFOCUS.

[79]. **(Abrahamsen M.S) : (**bovine T cell responses to cryptosporidium parvuminfection.-International Journal for Parasitology).(1998).28.1082-8.

[80]. DE GRAAF DC, VANOPDENBOSCH E, ORTEGA-MORA LM, ABBASSI H, PEETERS J. E (1999(a). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.,* **29**, 1269-1287.

[81]. CHARTIER C., (2002a), La cryptosporidiose des petits ruminants, Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine, 118-122.

[82]. Le GUILLOU S., (2002), La cryptosporidiose des petits ruminants, Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine, p 122.

[83]. MILLEMANN **Y., ADJOU K., MAILLARD R., POLACK B., CHARTIER C., (2003),** Les diarrhées néonatales des agneaux et des chevreaux, *Le point vétérinaire* n°233, 22 29.

[84]. CASTRO-HERMIDA J.A., DELAFOSSE A., PORS I., ARES-MAZAS E., CHARTIERC., (2005), *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids, *Veterinary record,* **157,** XXX-XXX.

[85]. NACIRI, M. .-Cryptosporidiose des ruminants et santé publique.-Le Point Vétérinaire, numéro spécial «Ruminants et santé publique», 1994, 26, 49-55.

[86]. RIEUX, Anaïs, 2013. Cryptosporidiose chez les ruminants domestiques en France: épidémiologie moléculaire et potentiel zoonotique. Poitiers: Université de Poitiers.

[87]. Smith, H.V., 1998. Detection of parasites in the environment. Parasitol. 117, S113–S141.

[88]. Henriksen, S.A., and J. Pohlenz. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet. Scand. 22, 594-596.

[89]. Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causapé, A.C., 1996. Prevalence of Cryptosporidium and Giardia infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). Vet. Parasitol. 66, 139-146.

[90]. Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G., Thompson, R.C., 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of Cryptosporidium pa rvumin human fecal specimens: clinical trial. J. Clin. Microbiol. 36, 995-998.)

[91]. Clark, D.P., 1999. New insights into human cryptosporidiosis. Clin. Microbiol. Rev. 12, 554-563.

[92]. Chartier, C., Mallereau-Pellet, M.P., Mancassola, R., Nussbaum, D., 2002.Detection of Cryptosporidium oocysts from goat kid faeces: Comparison of a latex agglutination test with three other conventional techniques. Vet. Res. 33, 169-177.

[93]. Casemore, D.P., 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. Broadsheet 128. J. Clin. Pathol.44, 445

[94]. CHARTIER C.,MALLEREAU PELLET M.P.,MANCASSOLAR., NUSSBAUMD .,(2002),Détection des ookystes de Cryptosporidium dans les fèces de caprins: comparaison entre un test d'agglutination au latex et trois autres techniques conventionnelles, Veterinaryr search,33 (2), 169-177.

[95].Anoyme6 : (UMVF):université médicale virtuelle francophone. International journal. – 451.

[96]. GARGALA, Gilles, 2013. La cryptosporidiose en France: une cause méconnue de diarrhée aiguë. In: Microbiologie clinique 2013[enligne]. Paris. 27 septembre 2013.

[97]. Charmette et Boufassa, (1988):-Cryptosporidiose : une maladie animale et humaine cosmopolite. Deuxiéme edition. Pages127.

[98]. Anonyme2 :

[99]. Current, W.L. (1990): Techniques and laboratory maintenance of Cryptosporidium. In Cryotosporidiosis of man and animals. J.P.Dubey, C.A.S, R,Fayer(Ed).Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 31 50.

[100]. Anonyme3 : http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2009/MiahJasmeen_ Cryptosporidiosis/Miah,%20Jasmeen-Parasite%20Project.htm.

[101]. Anonyme4 : CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION(CDC)).

[102]. Robert B., Collard A., Coppe P.D., Ginter., Antoine H. (1991): Epidémiologie dela cryptosporidiose bovine dans une ferme belge. Essai de prévention à l'aide du colostrum. Ann.Méd. Vét., 135 : p 441-446.

[103]. Garcia, L.S., Brewer, T.C., Bruckner, D.A., 1987. Fluorescence detection of Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 25,119-121.

[104]. LAPPIN M.R. (2005) Enteric Protozoal Diseases, Veterinary Clinics Small Animal Practice,35, 81-88.

[105]. CHALMERS R.M., KATZER F. (2013) Looking for Cryptosporidium: the application of advances in detection and diagnosis, Trends in Parasitology, 29,237-251.

[106]. Anonyme5 : source CDC.

[107]. **JOHNSTON S.P., BALLARD M.M., BEACH M.J., CAUSER L., WILKINS P.** Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of Giardia and Cryptosporidium Organisms in Fecal Specimens. Journal of clinical microbiology. Février 2003. Vol. 41, n°2, pp. 623-626.

[108]. JEX AR, SMITH HV, MONIS PT, CAMPBELL BE, GASSER RB (2008). Cryptosporidium-Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. Biotech. Adv., 26, 304-317

[109]. Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R. A., Tait, A., 2007. Cryptosporidium and Giardiaas foodborne zoonoses. Vet. Parasitol. 149, 29-40.

[110]. Xiao, L., Zhou, L., Santín, M.,Yang, W., and Fayer, R., 2007. Distribution of Cryptosporidium parvum subtypes in calves in eastern United States. Parasitol. Res.100, 701-706.

[111]. LECONTE M (2013). Le point sur la cryptosporidiose des Ruminants et les risques zoonotiques. Thèse Méd. Vét., Alfort.

[112]. Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp. Parasitol .124, 80-89.

[113]. SOTIRIADOU I., PANTCHEV N., GASSMANN D., KARANIS P. (2013) Molecular identification of Giardiaand Cryptosporidiumfrom dogs and cats, Parasite, 20.

[114]. OIE. (2008). Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres del'OIE.[En ligne],Mise à jour Le 21.06.2013,[http://www.oie.int/fr/normes-internationales/manuel-terrestre/acces-en-ligne/].(Consulter le 27/05/2013).

[115]. FONTAINE M., CADORE J. (1996). Vade-mecum du vétérinaire, 16e édition. Ed. Vigot, Paris, 1019-1035.

[116]. RHODES A., (2013).Fixation of tissues. In:Kim suvarna S., Layton C., Bancroft J.D.Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7thed. Churchill Livingstone/Elsevier, p 69-93.

[117]. Belkaid, Tabet Derraz, Zenaidi, Hamrioui. (1992). Cours De Parasitologie (Tome 1 Protozooses). Office des publications universitaires.Alger.192-205.p244.

[118]. Ruest, N. (2016). Avec la cryptosporidiose, la biosécurité est la meilleure alliée.Médecine vétérinaire, 40-43.

[119]. Allen, A. V., Ridley, D. S. (1970). Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. Journal of Clinical Pathology, 23(6), 545-546.

[120]. Guillaume, V. (2007). Parasitologie auto-évaluation Manipulations.De boeck et larcier.Belgique.152-184.p163.

[121]. Belkaid, Tabet Derraz, Zenaidi,Hamrioui. (1992). Cours De Parasitologie (Tome 1 Protozooses). Office des publications universitaires.Alger.192-205.p244.

[122]. Khelef, D. (2007). Enquète épidimiologique sur les diarrhées néonatales du veau dans certains élevages du centre et de l'est de l'Algérie et essai de prophylaxie (Thèse de doctorat d'etat es-sciences). Institut national d'agronomie El-Harrache Alger.

[123]. Gérard Abadjian. A., usj 2012. Histologie en pratique., faculté de médcine.)

[124]. **Anonyme7 :**(https://fr.wikipedia.org/wiki/cryptosporidiose.)