

POPULAR AND DEMOCRATIC REPUBLIC OF ALGERIA
MINISTRY OF HIGHER EDUCATION AND SCIENTIFIC RESEARCH



ZIANE ACHOUR UNIVERSITY OF DJELFA
FACULTY OF SCIENCES OF NATURE AND LIFE
DEPARTEMENT OF BIOLOGY



Epidemiology and the zoonotic potentiel of protozoans parasites, *Giardia* and *Cryptosporidium*, in livestock at the algerian steppe: Case of Laghouat and surrounding areas

Dissertation Submitted in Partial Fulfillment for the Requirement of PhD Degree in
impact of parasitic zoonoses on public health via water, food and the envirimnt

Submitted by

BENHASSINE Soumaya

Publicly defended before board members :

Chair :	M. SOUTTOU K.	Professor	Ziane Achour university, Djelfa
Examiner:	M ^{me} . AISSI M.	Professor	National veterinary school, Alger
Examiner :	M. HARHOURA K.	Professor	National veterinary school, Alger
Examiner :	M. LAATAMNA A.	MCA	Ziane Achour university, Djelfa
Examiner :	AIT BELKACEM A.	MCA	Ziane Achour university, Djelfa
Supervisor:	M. HAKEM A.	Professor	Ziane Achour university, Djelfa
Co-supervisor:	XIAO L.	DVM	Atlanta CDC, USA

Academic year : 2018/2019

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ZIANE ACHOUR DE DJELFA
FACULTE DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE



Thèse

Pour l'obtention de diplôme de

Doctorat de troisième cycle

Filière : Biologie

Option : Impact des zoonoses parasitaires sur la santé publique via l'eau, les aliments
et l'environnement

Présenté par:

Melle. BENHASSINE Soumaya

Intitulée:

**Epidémiologie et potentiel zoonotique des protozoaires
parasites, *Giardia* et *Cryptosporidium*, chez les animaux
d'élevage dans la steppe algérienne : Cas de Laghouat et
régions limitrophes**

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

Président :	M. SOUTTOU K.	Professeur	Université Ziane Achour, Djelfa
Examineur :	M ^{me} . AISSI M.	Professeur	Ecole nationale vétérinaire, Alger
Examineur :	M. HARHOURA K.	Professeur	Ecole nationale vétérinaire, Alger
Examineur :	M. LAATAMNA A.	MCA	Université Ziane Achour, Djelfa
Examineur :	AIT BELKACEM A.	MCA	Université Ziane Achour, Djelfa
Directeur de Thèse :	M. HAKEM A.	Professeur	Université Ziane Achour, Djelfa
Co-directeur de thèse :	XIAO L.	Professeur	CDC d'Atlanta, USA

2018/2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Au terme de ce travail je tiens à remercier vivement, tout d'abord, les personnes qui ont accepté de participer au jury de cette thèse :

Monsieur SOUTTOU K., professeur de parasitologie à l'université de Djelfa, vous m'avez fait vraiment l'honneur d'accepter de présider le Jury de ce travail. Soyez assuré de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.

Madame AISSI M. et monsieur HARHOURA K., professeurs de Parasitologie à l'école vétérinaire d'Alger. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail. Veuillez trouver ici, chers Maîtres, l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Et messieurs, AIT BELKACEM A. et LATAAMNA A., professeurs à l'université de Djelfa, Je vous remercie, messieurs, de nous avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse. Qu'il me soit permis, de vous exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements.

A mon maître et directeur de thèse, professeur HAKEM A., j'adresse mes remerciements les plus particulières de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon rêve en me confiant ce travail riche d'intérêt et d'enthousiasme. Je saisis cette occasion pour vous exprimer ma profonde gratitude tout en vous témoignant mon plus grand respect.

J'adresse mes sincères remerciements également à l'ensemble de personnes qui ont contribué à la réalisation des travaux de cette thèse :

Au personnel du laboratoire de Parasitologie de département de Biologie à l'université de Laghouat qui m'ont accompagné au quotidien durant les quatre années de pratique au sein de leur laboratoire. Merci pour votre aide, votre sympathie, et votre soutien toute au long de la réalisation de ce travail, sans oublier les professeurs BENCHATOUH A. et CHAIBI R. pour leur aide dans la collecte des échantillons et la conception des mes cartes géographiques.

Au docteur XIAO L. et à ROELLIG D. pour les efforts déployés au cours de l'analyse moléculaire des mes échantillons au sein de leur laboratoire au CDC d'Atlanta.

Et bien sûr au personnel du laboratoire de biologie de Djelfa, de leur disponibilité et de leur coopération pendant la réalisation de mes colorations dans leur laboratoire.

Et enfin mes remerciements les plus vives vont aux vétérinaires praticiens, BOUCHERIT I., DJELIEL A., DADA Y., KIDAR K., RIGHI I., BELEMBAREK M. et autres, qui ont contribué efficacement à la collecte des échantillons animaux au cours de ce travail.

Dédicace

A ma très chère mère

A qui je dois tout.

Vous m'avez toujours aidé et encouragé tout au long de mes études.

Vous êtes et vous serez toujours pour moi le symbole de

l'honnêteté, de la gentillesse, de la serviabilité et de la simplicité.

*Que Dieu tout puissant, vous protège et vous assure une bonne santé et
longue vie.*

A la mémoire de mon père et mon seul frère

J'aurais tant aimé que vous soyez à mes côtés ce jour.

*Aucune dédicace ne serait exprimer mon amour éternel et mon chagrin en
exposant cette thèse en votre absence.*

Ni la mort ni le temps nous vous ferons oublier.

Que vos âmes reposent en paix.

A mes très chères sœurs

*Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes
sentiments d'amour et de tendresse envers vous.*

Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

*Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le
bonheur qu'il faut pour vous combler.*

*Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce
travail.*

A tous mes amis

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

Que dieu vous bénisse et vous donne plein de joie et de santé.

Soumaya

Sommaire

Listes des tableaux	I
Listes des figures	II
Liste des abréviations	IV
Introduction.....	1

Chapitre I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

I. Historique	4
I.1. Cryptosporidiose	4
I.2. Giardiase.....	4
II. Biologie et systématique	6
II.1. Etude de <i>Cryptosporidium</i>	6
II.1.1. Morphologie et structure.....	6
II.1.2. Cycle biologique.....	8
II.1.3. Systématique	10
II.2. Etude de <i>Giardia</i>	13
II.2.1. Morphologie et structure.....	13
II.2.2. Cycle de vie.....	14
II.2.3. Systématique	16
III. Rôle pathogène	20
III.1. Expression clinique	20
III.1.1. Cryptosporidiose	20
III.1.2. Giardiase	22
III.2. Pouvoir pathogène	24
VI. Epidémiologie.....	26
VI.1. Répartition et prévalence	26
VI. 1.1. Répartition	26

VI.1.1.1. Répartition en fonction de la situation géographique	26
VI.1.1.2. Répartition en fonction de l'espèce d'élevage	27
VI.1.2. Prévalence	28
VI.2. Sources de contamination et modes de transmission	28
VI.3. Facteurs prédisposants	30
VI.3.1. Facteurs intrinsèques	30
VI.3.2. Facteurs extrinsèques	30
V. Diagnostic	31
V.1. Méthodes coproscopiques	32
V.1.1. Examen microscopique sans coloration	32
V.1.1.1. Examen direct sans enrichissement	32
V.1.1.2. Examen direct avec enrichissement	33
V.1.2. Examen microscopique après coloration	34
V.1.2.1. Coloration au MIF (Merthiolate Iode Formol)	34
V.1.2.2. Coloration au Giemsa	35
V.1.2.3. Coloration à l'hématoxyline ferrique	36
V.1.2.4. Coloration au trichrome de Gomori-Wheatley	37
V.1.2.5. Coloration négative de Heine	37
V.1.2.6. Coloration à l'Auramine-Phénol	38
V.1.2.7. Coloration de Zeihl-Neelsen modifiée	38
V.2. Méthodes immunologiques	40
V.2.1. Le test d'ELISA	40
V.2.2. Immunofluorescence direct (DFA)	41
V.2.3. Analyse immunochromatographique (ICT)	41
V.3. Méthodes moléculaires	42
V.3.1. Techniques de PCR	43
V.3.1.1. PCR simple	44
V.3.1.2. PCR nichée	44
V.3.1.3. PCR en temps réel (qPCR)	44

V.3.1.4. PCR multiplexe	45
V.3.2. Marqueurs (cibles) utilisés en PCR	45
IV.1. Traitement	49
IV.2. Prophylaxie	50

Chapitre II. Méthodologie

I. Echantillonnage.....	52
I.1. Régions et sites d'étude.....	52
I.2. Animaux et élevages étudiés.....	55
I.3. Prélèvement et conservation.....	57
II. Analyse de laboratoire.....	58
II.1. Analyses par approches classiques.....	58
II.1.1. Préparation des frottis et coloration de Ziehl-Neelsen modifiée...59	
II.2.2. Concentration par flottation au sulfate de zinc 33%.....	60
II.1.3. Examen microscopique.....	62
II.2. Analyse par approches moléculaires.....	62
II.2.1. Extraction d'ADN.....	63
II.2.2. Analyse PCR.....	64
II.2.2.1. Préparation à la PCR.....	64
II.2.2.2. Procédure de la PCR.....	66
II.2.2.3. Révélation des produits de la PCR.....	67
II.2.2.4. Lecture et interprétation des résultats.....	68
II.2.3. Séquençage.....	68
II.2.3.1. Purification des produits de PCR secondaire	68
II.2.3.2. Réaction de séquençage.....	69
II.2.3.3. Analyse des séquences.....	70
III. Analyse statistique.....	70

Chapitre III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

I. Etude par approches classiques.....	71
I.1. Résultats des analyses coproscopiques.....	71
I.2. Résultats des analyses épidémiologiques.....	73
I.2.1. Prévalence	73
I.2.2. Etude des facteurs de risque.....	76
I.2.2.1. Age	76
I.2.2.2. Le type d'espèce d'élevage	81
I.2.2.3. Région d'étude.....	83
I.2.2.4. Type d'élevage.....	84
I.2.3. Statut clinique	88
I.2.3.1. Fréquence de <i>Giardia</i> spp. en fonction du statut clinique.....	88
I.2.3.2. Fréquence de <i>Cryptosporidium</i> en fonction du statut clinique.....	90
II. Etude par approches moléculaires.....	95
II.1. Caractérisation moléculaire de <i>Giardia intestinalis</i> et <i>Cryptosporidium</i> spp. Chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie.....	95
II.2. Potentiel zoonotique de <i>G intestinalis</i> associé aux animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie.....	99
II.3. Potentiel zoonotique de <i>Cryptosporidium</i> spp. associé aux animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie.....	100
Conclusion et perspectives.....	103
References bibliographiques.....	106
Annexes	
Resumés	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Espèces Hôtes et site d'infestations des espèces de <i>Cryptosporidium</i>	12
Tableau 2. Espèces et/ou Assemblages et hôtes de <i>Giardia</i>	18
Tableau 3. Les marqueurs Couramment utilisés pour la caractérisation moléculaires des espèces de <i>Giardia</i> et de <i>Cryptosporidium</i>	48
Tableau 4. Les prélèvements collectés dans la steppe centrale d'Algérie en fonction de l'espèce d'élevage et des régions prospectées	56
Tableau 5. Les fermes enquêtées en fonction de l'espèce d'élevage et des régions prospectées dans la steppe centrale d'Algérie	56
Tableau 6. Prélèvements fécaux collectés à partir des animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie en fonction de l'âge et de l'espèce d'élevage durant la période s'étalant de 2014 à 2018.....	58
Tableau 7. Prévalence de la Cryptosporidiose bovine en Algérie (2007-2018)	74
Tableau 8. Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> spp. en fonction de l'âge chez les trois espèces d'élevage examinées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)	76
Tableau 9. Prévalence de <i>Giardia</i> spp. en fonction de l'âge chez les trois espèces d'élevage examinées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018).....	77
Tableau 10. Prévalence de <i>Giardia</i> spp. et de <i>Cryptosporidium</i> spp. en fonction des régions d'étude prospectés dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018).....	83
Tableau 11. Les fermes positives à <i>Giardia</i> spp. et les fermes positives à <i>Cryptosporidium</i> spp. chez l'ovine dans la steppe centrale d'Algérie en fonction du type d'élevage (2014-2018)	85
Tableau 12. Les fermes positives à <i>Giardia</i> spp. et les fermes positives à <i>Cryptosporidium</i> spp. chez le caprin dans la steppe centrale d'Algérie en fonction du type d'élevage (2014-2018).....	86
Tableau 13. Les fermes positives à <i>Giardia</i> spp et les fermes positives à <i>Cryptosporidium</i> spp. chez le bovin dans la steppe centrale d'Algérie en fonction du type d'élevage (2014-2018).....	87
Tableau 14. Les cas positifs en <i>Giardia</i> en fonction du statut clinique chez les animaux d'élevage examinés dans les trois régions étudiées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018).....	89

Tableau 15. Les cas positifs en <i>Cryptosporidium</i> en fonction du statut clinique chez les animaux d'élevage examinés dans les trois régions étudiées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018).....	92
Tableau 16. Génotypage de <i>G. intestinalis</i> dans les échantillons d'ovin et de caprin issus de la région de Laghouat dans la steppe centrale d'Algérie.	96
Tableau 17. Génotypage de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans les échantillons d'ovin et de caprin issus de la région de Djelfa dans la steppe centrale d'Algérie.....	96

Liste des Figures

Figure 1. Structure des différentes formes de <i>Cryptosporidium</i> spp.	7
Figure 2. Cycle évolutif de <i>Cryptosporidium</i> spp.	9
Figure 3. Relations phylogénétiques entre espèces et génotypes de <i>Cryptosporidium</i> basées sur l'analyse de la concaténation de séquences nucléotidiques de l'ARNr 18s, de l'actine et de l'HSP70.	11
Figure 4. Structure et morphologie du trophozoïte et du kyste de <i>Giardia</i> spp.	14
Figure 5. Cycle évolutif de <i>Giardia intestinalis</i>	15
Figure 6. Relations phylogénétique au sein des Assemblages de <i>G. duodenalis</i> basées sur l'analyse par neighbor-joining d'une séquence nucléotidique de 709-bp du gène <i>gdh</i>	17
Figure 7. Relations phylogénétique de <i>Giardia</i> spp. obtenue par l'analyse de neighbor-joining de la séquence nucléotidique du gène triose phosphate isomérase (<i>tpi</i>).....	19
Figure 8. Situation géographique de la steppe algérienne	53
Figure 9. Sites d'échantillonnage choisis dans la steppe centrale d'Algérie pour l'étude de <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i>	54
Figure 10. Prélèvement et conservation des échantillons de fèces issus des animaux d'élevage de la steppe centrale d'Algérie.....	57
Figure 11. Réalisation du frottis à partir d'un prélèvement fécal.....	59
Figure 12. Technique de coloration de Zeihl-Nelsen en photos.....	60
Figure 13. Technique de flottation au Sulfate de Zinc à 33% en photos.....	61
Figure 14. Observation microscopique des kystes de <i>Giardia</i> spp. dans les fèces des animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie après concentration par flottation au sulfate de Zinc 33%	71
Figure 15. Observation microscopique des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans les fèces des animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie après coloration au Zeihl-Neelsen modifiée	72
Figure 16. Prévalence de <i>Giardia</i> et de <i>Cryptosporidium</i> en fonction du statut clinique chez les animaux d'élevages examinées dans les trois régions étudiées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018).....	81
Figure 17. Fréquence de <i>Giardia</i> spp. chez les animaux d'élevage diarrhéiques et non-diarrhéiques dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)	89

Figure 18: Fréquence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux d'élevage diarrhéiques et non-diarrhéiques dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)91

Figure 19: PCR-nichée sur *tpi* montrant 13 échantillons positifs pour *G. intestinalis* (Assemblage E)97

Figure 20: PCR-RFLP avec digestion par *MboII* des produits de PCR secondaires 18S ARNr, montrant 3 échantillons positifs pour *C. xiaoi*.....97

Liste des abréviations

ABI: Applied Biosystems. Inc.

bg : Beta-giardin

C° : Degré Celsius

COWP : *Cryptosporidium* oocyst wall protein

cm : Centimètre

DAF : Direct Fluorescent Antibodies

DNA : Deoxyribo-Nucleic Acid

dNTP : Désoxynucleotides triphosphates

D.P.A.T : Direction de Planification et de l'Aménagement du Territoire

D.S.A : Direction des Services Agricoles

EDTA: Acide Ethylène-Diamine-tétra-Acétique

***efl-α* :** Elongation factor 1-alpha

EIA : Enzyme Immunoassay

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

***gdh* :** Glutamate dehydrogenase

***gp60* :** Glycoprotein 60

HSP70 : Heat shock protein 70

Hg : Mercure, Hydrogyre

ICT : Immunochromatographic Test

ICZN : International Code of Zoological Nomenclature

ITS : Internal transcribed spacer

g : Gramme

Mg cl₂ : Chlorure de magnésium

ml : Millilitre

µl : Microlitre

mM : Mili mol

mn : Minute

nM : Nano mol

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OIE : Office International des Epizooties

Pb : Paire de bases

PVA : Polyvinyl Alcohol

qPCR : Quantitative real-time polymerase chain reaction

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

rpm : Revolution par minute

RNA : Ribonucleic Acid

18S ARNr : 18S ribosomal RNA

s : Seconde

SAF : Sodium Acetate Formalin

spp : Species pluralis

Tpi : Triose phosphate isomerase

Introduction

Les parasitoses à protozoaires intestinaux, *Giardia* et *Cryptosporidium*, comptent parmi les plus fréquentes chez les humains (Thompson, 2008 ; Feng et Xiao, 2011), les données chiffrées montrent que 280 millions de cas de diarrhées annuellement diagnostiqués chez l'homme sont dues à *Giardia* spp. (Geurden, 2007 ; Feng et Xiao, 2011 ; Cristanziano *et al.*, 2014). La diarrhée n'est pas le seul impact associé à la giardiose chez l'homme, elle se répercute également sur la croissance pondérale et occasionne des troubles aux fonctions cognitives chez les enfants lorsqu'elle passe à la chronicité chez ceux-ci (Favennec *et al.*, 2006 ; Cristanziano *et al.*, 2014 ; Calero-Bernal et Carmena, 2018).

Quand à la cryptosporidiose, elle engendre des symptômes particulièrement plus sévères qui peuvent être fatales chez les immunodéprimés (Leitch *et al.*, 2011). Elle peut développer des gastroentérites aiguës chez les immunocompétents qu'ils l'acquièrent généralement lors des voyages à l'étranger (Nichols, 2007), elle est actuellement l'une des infestations de plus en plus associée aux diarrhées chez les voyageurs (Bamaiyi et Redhuan, 2016 ; Baroudi *et al.*, 2017 ; Geurden, 2007).

Qu'elle soit cryptosporidiose ou giardiose, elles sont souvent contractées via la voie hydrique à partir des réseaux des eaux publiques, les eaux de récréations (Raccurt, 2007; Leitch *et al.*, 2011 ; Calero-Bernal et Carmena, 2018) ou d'irrigation (Rieux, 2013 ; Calero-Bernal et Carmena, 2018), une voie de transmission qui en grande partie en relation avec le péril fécale (Olson et Buret, 2001 ; Calero-Bernal et Carmena, 2018;G), donc d'origine fréquemment anthropologique. Cette voie de transmission semble majeure dans l'épidémiologie de ces pathogènes (Calero-Bernal et Carmena, 2018 ; Rieux, 2013 ; Adam *et al.*, 2016). Néanmoins elle n'exclut pas leur transmission zoonotique qui s'effectue soit au travers l'environnement souillé par les déjections animales ou par contact direct à ces animaux (Bajer, 2008 ; Robertson, 2009; Leitch *et al.*, 2011 ; Rieux, 2013). Il est en effet à l'heure actuelle mal connu, la proportion avec laquelle intervient cette voie de transmission dans l'épidémiologie de ces deux parasitoses (Xiao et Feng, 2008 ; Thompson et Ash, 2016 ; Calero-Bernal et Carmena, 2018).

Depuis quelques années, les parasites des genres *Cryptosporidium* et *Giardia* font l'objet de nombreuses recherches en santé animale, grâce auxquelles plusieurs espèces et/ou génotypes ont été identifiées. Des espèces zoonotiques isolés à la fois chez l'homme et l'animale ont été décelées dans de nombreuses études où les deux, animal et homme, se

côtoient (Mahdi et Ali, 2002 ; Robertson, 2009 ; Helmy *et al.*, 2013; Wegayehu *et al.*, 2013; Squire *et al.*, 2017; Squire et Ryan, 2017; Rehbein *et al.*, 2018) et même en absence de contact évident (Robertson, 2009).

Dans ce contexte, les animaux domestiques et sauvages sont tous ensembles incriminés, toutefois le rôle des animaux domestiques a été beaucoup plus recherché notamment chez les animaux d'élevage (Xiao et Fayer, 2008 ; Castro-Hermida *et al.*, 2007b) en raison de leur proche proximité aux humains et la prévalence parasitaire qui semble beaucoup plus élevées chez ceux-ci (Xiao, 1994; O'Handley *et al.*, 2006 ; Robertson, 2009 ; Geurden *et al.*, 2010).

L'intérêt grandissant pour l'étude de ces parasites chez les animaux d'élevage n'est plus seulement motivé par la connaissance du potentiel zoonotique qui leur sont associé mais il naît également de la nécessité d'évaluer les facteurs de risque en rapport avec ces parasitoses chez les animaux (Dahmani *et al.*, 2017). Et cela pour permettre l'instauration des mesures d'hygiène et de prévention adéquates et réduire leurs répercussions dans les élevages animaux, vu les énormes pertes économiques et sanitaires qu'entraînent ces deux là, *Giardia* spp. et *Cryptosporidium* spp. chez ces espèces animales (O'Handley *et al.*, 2006 ; Castro-Hermida *et al.*, 2007b).

Cryptosporidium spp. et *Giardia* spp. sont considérés comme des pathogènes importants dans l'étiologie de la diarrhée chez les jeunes animaux de rente (Castro-Hermida *et al.*, 2005b ; Fayer *et al.*, 2006 ; Castro-Hermida *et al.*, 2007b). Les cryptosporidies sont impliquées dans la morbidité et la mortalité des jeunes avant le sevrage, les travaux conduits à cet effet en montre des taux importants, la morbidité a été estimée de 80 à 100% dans les élevages caprins et ovins (Chartier *et al.*, 1999 ; De Graaf *et al.*, 1999) et la mortalité peut dépasser 50% dans certains cas (Chartier *et al.*, 1999). Cet effet semble moins net pour *Giardia*, certains confirment sa pathogénicité (Xiao, 1994 ; Olson, 2002; O'Handley *et al.*, 1999; Ozdal *et al.*, 2009; Minetti *et al.*, 2014; Geurden *et al.*, 2010) tandis que d'autres l'excluent (Olson et Buret, 2001 ; Thompson *et al.*, 2008 ; Geurden *et al.*, 2010) mais son impact sur la production reste cependant bien établi tant dans les infestations naturelles qu'expérimentales, et qui semble assez importants (Aloisio *et al.*, 2006 ; O'Handley *et al.*, 2006 ; Feng et Xiao, 2011 ; Sweeny *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012).

En Algérie comme au monde l'étude de ces deux parasitoses a concerné notamment le bovin (Baroudi *et al.*, 2017 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2018 ; Ouakli *et al.*, 2018), rares sont les études qui l'ont abordées chez les petits ruminants (Baroudi *et al.*, 2015 ; Dahmani *et al.*, 2017) surtout les recherches en relation avec leur épidémiologie et le potentiel zoonotique associé aux animaux d'élevage. Cela est probablement dû au manque des études conduites dans les régions les plus peuplées par les animaux d'élevage qui sont en Algérie les régions steppiques.

Le cheptel animal algérien considéré des plus importants du nord d'Afrique (Aidoud *et al.*, 2006) est formé essentiellement d'ovin et de caprin (Bencherif, 2011), une fraction de 94,5% est leur sont attribuées, le bovin ne représente que 5,5 % du cheptel algérien (Ministère de l'agriculture et de développement rurale, 2016. In Sahrahoui *et al.*, 2019). Ce cheptel est situé principalement dans la steppe qui est en effet une région à vocation pastorale où l'élevage constitue une activité ancestrale largement pratiquée par la population locale (Aidoud *et al.*, 2006 ; Bencherif, 2011), un quart de sa population sont des éleveurs et 80% du cheptel s'y trouve (Bencherif, 2011).

Vu l'immense effectif animal pâturant dans la région steppique et devant l'impact sanitaire et économique de deux parasites de *Cryptosporidium* et *Giardia* tant sur plan public que vétérinaire, nous sommes jugé utile d'entreprendre une étude sur les animaux d'élevage dans cet environnement. Pour ce faire nous nous sommes fixé les objectifs suivants :

- Déterminer la prévalence des deux parasites et certains des facteurs de risque qui leur sont associés chez les animaux d'élevage (Ovin, caprins, bovins) dans certaines régions de la steppe algérienne.
- Identifier les géotypes et/ou les Assemblages des deux parasites afin de pouvoir évaluer le potentiel zoonotique associé aux animaux d'élevage de la steppe dans cet environnement.

Ce travail constitue entre autre également une petite contribution de notre part à la compréhension de l'effet qu'exercent ces deux pathologies sur les animaux d'élevage et leur transmission zoonotique dans les régions sud du globe terrestre que l'Algérie en fait partie, là où les animaux supposés exercer le plus d'impact sur la population humaine (Robertson, 2009). Est-il réellement le cas?

Chapitre I.

**L'état actuel des connaissances sur
Giardia et *Cryptosporidium* chez
les animaux d'élevage et l'homme**

I. Historique

I.1. Cryptosporidiose

Le parasite de *Cryptosporidium spp.* a été décrit pour la première fois au 18^{ième} siècle, Ernest Tyzzer (1907) trouva un petit organisme au niveau de la muqueuse gastrique de la souris dans son laboratoire qu'il nomma *C. muris*.

En 1912, une espèce plus petite trouvée dans le petit intestin de la souris a également été décrite par Tyzzer et nommée cette fois-ci *C. parvum*. Depuis sa découverte, de nombreuses autres espèces de *Cryptosporidium* furent isolées et décrites chez divers animaux domestiques et sauvages (Fayer et Ungar, 1986 ; Šlapeta, 2009 ; Raja Nur Rahifah, 2017) : *C. crotali* du serpent en 1925, *Cryptosporidium* du lapin en 1929, *Cryptosporidium* du dingo d'Australie en 1964, *C. wariri* du cobaye en 1971 et celui du singe en 1972, *C. felis* du chat en 1979 et beaucoup d'autres espèces agrandissant ainsi le spectre d'hôtes à ce parasite (Baroudi, 2014).

Si la découverte de ces parasites furent ancienne, son implication en pathologie bovine ne fut mise en évidence qu'à la fin des années 1970 (Morin *et al.*, 1976 ; Pohlenz *et al.*, 1978). Elle a été décrite pour la première fois, par Panciera *et al.* (1971) chez une génisse de 8 mois exprimant une cryptosporidiose clinique, puis en 1974 deux cas de cryptosporidiose ont été rapportés chez deux veaux âgés l'un de deux semaines et l'autre de moins de deux semaines présentant des diarrhées aiguës (Barker et Carbonell, 1974 ; Meuten *et al.*, 1947 ; Fayer *et al.*, 2009).

Dans cette même période la cryptosporidiose fut apparue chez l'homme, elle fut observée pour la première fois chez une petite fille âgée de trois ans en France (Nîme *et al.*, 1976), puis chez un patient immunodéprimé atteint de diarrhées sévères au Etats Unies d'Amérique (Meisel *et al.*, 1976). 10 ans plus tard ce pathogène fut décrit officiellement responsable de diarrhées spontanément résolutive chez les immunocompétents (Costa *et al.*, 2017).

Les caprins sont reconnue également réceptifs, un premier cas a été découvert en Australie chez un chevreau Angora de deux semaines d'âge, qui trouvait la mort après une brève diarrhée sévère (Mason *et al.*, 1981) et ils sont aujourd'hui considérés comme une cause majeure de diarrhées néonatales chez les ruminants (Paul *et al.*, 2014).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

En 1993, la transmission hydrique de ce parasite fut élucidée lorsque les diarrhées se sont avérées liées à l'eau, et cela suite à l'épidémie de Milwaukee en USA qui avait emportées 100 morts parmi 400000 cas de cryptosporidiose confirmées (Baroudi, 2014), il est connu à l'heure actuelle, des pathogènes les plus sérieux et difficile à contrôler dans les réseaux des eaux publics (Tzipori et Ward, 2002).

Mais son pouvoir zoonotique ne fut révélé qu'à la fin des années 1990 suite à l'émergence des outils d'analyse de biologie moléculaire (Šlapeta, 2009), la connaissance des différents isolats et de leurs origines sont devenues donc possible après le progrès spectaculaire réalisée par rapport à leur taxonomie (Xiao, 2010).

I.2. Giardiase

La découverte de *Giardia* est plus ancienne, la première description remonte au 17^e siècle où elle fut découverte par Antony Van Leeuwenhoek dans ses propres selles diarrhéiques. Toutefois il fallait attendre le 19^e ème siècle pour qu'il soit effectivement reconnu, en 1859 Czech wilhem Lambl donna une description plus détaillée sur ce parasite qu'il nomma *Cercomonas intestinalis* (Brian, 2005 ; Midlej *et al.*, 2017).

En 1882, Künstler donna le nom *Giardia* aux différentes espèces de ce parasite dont l'utilisation en tant que nom du genre fut dès lors validé (Favennec *et al.*, 2006 ; Smith et Paget, 2007), mais la dénomination finale de ces espèces resta débattue pendant plus de 50 ans, ce n'est qu'en 1952 que Filice élucida ce mystère en proposant des critères morphologiques qui ont permet l'identification de trois espèces, *G. lamblia*, *G. muris* et *G. agilis* (Geurden *et al.*, 2010).

A la fin des années 1950 *Giardia intestinalis* chez l'homme fut reconnu pathogène, elle fut révélé responsable de diarrhée chez son hôte. Par la suite elle fut impliquée dans de nombreuses épidémies d'origine hydrique rapportées en Europe et aux Etats-Unis entre 1960 et 1980 (Bertrand, 2005).

En médecine vétérinaire le premier cas de giardiase bovine fut rapporté en 1921 mais l'impact clinique fut réellement établi un peu plus tard en 1987 et fut désormais avéré pathogène dans les élevages bovins (Guerden, 2007).

Cet ainsi que les parasites de *Giardia* ont suscité l'attention et l'intérêt des chercheurs qui ont conduit de multiples études afin d'explorer de nouveaux hôtes pour ce parasite. En 1987 une nouvelle espèce fut décrite chez les oiseaux par Erlandsen et

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Bemrick qui est *G. psittaci*, peu après Feely (1988) décrivait *G. microti*, espèces qui parasitent les rongeurs et Erlandsen *et al.* en 1990 isola l'espèce de *G. ardeae* qui parasite les oiseaux.

Au début des années 1990 l'objectif de ces études s'est penché sur le rôle associé aux animaux d'élevage dans la transmission zoonotique de ces parasites aux humains en utilisant les outils révolutionnaires de la biologie moléculaire (Geurden *et al.*, 2010). Dès lors les travaux sur ce parasite s'intéressent d'avantage à l'exploration de leur identité génétique et l'épidémiologie moléculaire en relation avec la maladie (Geurden et Claerebout, 2010).

II. Biologie et systématique

II.1. Etude de *Cryptosporidium*

II.1.1. Morphologie et structure

Les parasites de *Cryptosporidium* sont de très petit coccidies intracellulaires obligatoires (Ridley, 2012 ; Xiao et Ryan, 2014). Ils colonisent le tractus intestinal ainsi que d'autres sites extra-digestifs peu communs (Conjonctive de l'œil, poumons, vésicule biliaire, les ganglions lymphatiques, gonades et voies utéro-vaginales) chez diverses hôtes vertébrés (Samuel *et al.*, 2001 ; Fayer, 2003 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Fayer, 2008).

Les cryptosporidies se présentent sous deux formes de vie différentes. La forme exogène qui est l'oocyste, il est très résistant dans le milieu extérieur et constitue donc un bon moyen de dissémination dans l'environnement. Et la forme endogène qui est une forme très sensible ne pouvant se développer qu'à l'intérieur de l'hôte.

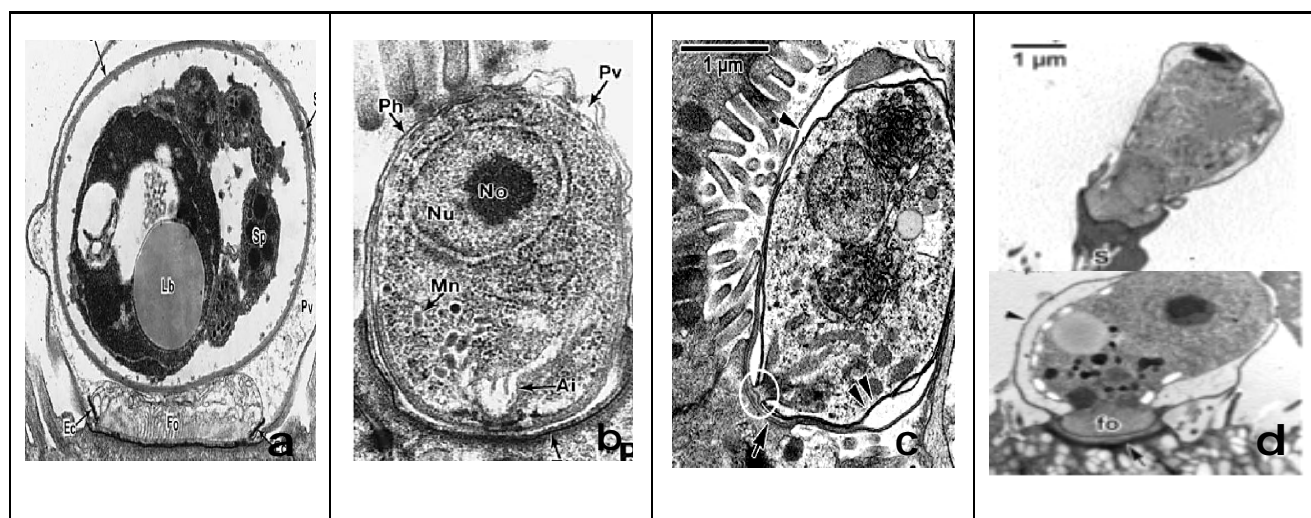
L'oocyste a une forme sphérique, il est entouré d'une paroi épaisse qui le protège des stress environnementaux (Ridley, 2012 ; Fayer, 2008). Cette paroi est composée de trois couches de nature glycoprotéique et/ou lipoprotéique (Fayer, 2008), là-dedans, l'oocyste renferme un corps résiduel et 4 sporozoïtes nus peu visibles même après coloration (Fayer, 2008 ; Ridley, 2012). La taille des oocystes cryptosporidiens varie généralement de 3 à 6 µm mais elle peut parfois atteindre 7,4 µm tel est le cas de *C. muris* (De Graaf *et al.*, 1999), voire même 8 µm comme c'est le cas de *C. andersoni* (Xiao et Carma, 2006).

Le stade endogène est représenté par des formes variées (trophozoïte, merozoïte et gamonte) dont la structure diffère considérablement. Le trophozoïte est une cellule

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

diffuse à un noyau unique proéminent et une organelle d'attachement/nourricière bien développée. Le merozoïte, celui-là est composé d'une double membrane externe et de nombreuses organites, anneaux apicaux ; conoïdes, micronèmes ; rophtries ; granules polaires et un collier dense, qui forment ensemble une structure uniforme qu'on appelle « le complexe apical » dont le rôle est associé à l'invasion et l'extension parasitaire. Ce sont les formes qui perdurent le plus dans l'organisme hôte.

Il y a également les formes de la reproduction sexuée, microgamonte et macrogamonte, qui se rencontrent moins fréquemment à l'intérieur de l'hôte car ils sont produits à nombre réduit à la fin du cycle merogonie, ils se forment après plusieurs générations successives de merozoïtes où seulement quelques-uns d'entre eux se spécialisent pour se transformer en gamontes. Le microgamonte et le macrogamonte, ces deux stades ont une forme sphérique à ovoïde, toutefois ils se distinguent l'un de l'autre principalement par le noyau qui est unique et gros dans le macrogamonte et multiples, denses et petits dans le microgamonte (Fayer, 2008; Bouzid *et al.*, 2013). La figure 1 illustre en photos les différentes formes que peut prendre le parasite de *Cryptosporidium* spp. durant les différentes phases de sa vie.



(a)Oocyste, (b) Sporozoïte et Merozoïte, (c) Trophozoïte, (d) Gamontes : Microgamonte en haut et Macrogamonte en bas

Sp : sporozoïtes ; **Lp** : Corps lipidique ; **Pv** : vacuole parasitophore ; **fo** : organelle nourricière ; **mv** : microvillosités ; **Ph** : Plasmalemma de la cellule hôte ; **Mn** : Micronème; **No** : Nucleus, **Nu** : Noyau

Figure 1: Structure des différentes formes de *Cryptosporidium* spp. (Fayer, 2008)

II.1.2. Cycle biologique

Toutes les étapes du développement du parasite de *Cryptosporidium* s'effectuent chez un hôte unique dans les cellules épithéliales de son tractus gastro-intestinal. A ce

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

niveau-là ils sont à disposition intracellulaire dans la bordure en brosse de la cellule intestinale.

Le cycle (Figure 2) commence par l'ingestion de l'oocyste à partir de l'environnement via l'eau, les aliments et la terre. Suite à sa pénétration à l'intérieur de l'hôte, l'oocyste subit une excystation dans l'intestin sous l'effet du pouvoir réducteur de l'estomac ainsi que les enzymes biliaires et/ou pancréatiques, et libère 4 sporozoïtes nus (Fayer et Xiao, 2007).

Les sporozoïtes s'attachent à la membrane de la bordure en brosse de la cellule épithéliale, à l'intérieur de celle-ci une vacuole parasitophore l'encercle et la positionne dans l'espace membrano-cytoplasmique.

Les trophozoïtes à l'intérieure des vacuoles parasitophores des cellules épithéliales grossissent et donne naissance à des schizontes ou mérontes de types I au niveau des cellules épithéliales, qui à maturité produisent de 6 à 8 mérozoïtes par reproduction asexuée (Fayer et Xiao, 2007).

Les mérontes de type I à leur tour envahissent les cellules voisines saines et formant des schizontes ou mérontes de type II. Les mérontes de type II contiennent 4 mérozoïtes, ils sont issus de la deuxième reproduction asexuée, ces mérozoïtes peuvent soit initier un cycle auto-infestant reformant des mérontes de type I ou encore amorcer le cycle sexuel du parasite (Fayer et Xiao, 2007).

Au cours du cycle sexuel, les mérozoïtes de type II envahissent de nouvelles cellules épithéliales et se différencient en gamontes. Certains mérozoïtes se transforment en microgamontes mâles et d'autres donnent des macrogamontes femelles.

Le microgamonte mâle produit jusqu'à 16 microgamètes qui, une fois à maturité, sont libérés dans la lumière de l'iléon. Ceux-ci s'attachent et pénètrent dans la vacuole parasitophore pour féconder le macrogamète et former un zygote (Fayer, 2007 ; Chalmers et Davies, 2010).

Une fois formé, le zygote subit la sporulation par une série de méioses qui aboutissent à la formation d'un oocyste sporulé et directement infectant contenant 4 sporozoïtes.

Dans cette phase les cryptosporidies produisent deux types d'oocystes :

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Les oocystes à paroi mince évoluant dans l'intestin et qui sont responsables d'un nouveau cycle chez le même hôte (Auto-infestation) donc doué d'un caractère infectieux élevée ;

Et ceux d'une paroi épaisse évacués à l'extérieur là où ils assurent le passage chez un nouvel hôte (Euzéby, 2008 ; Chalmers et Davies, 2010).

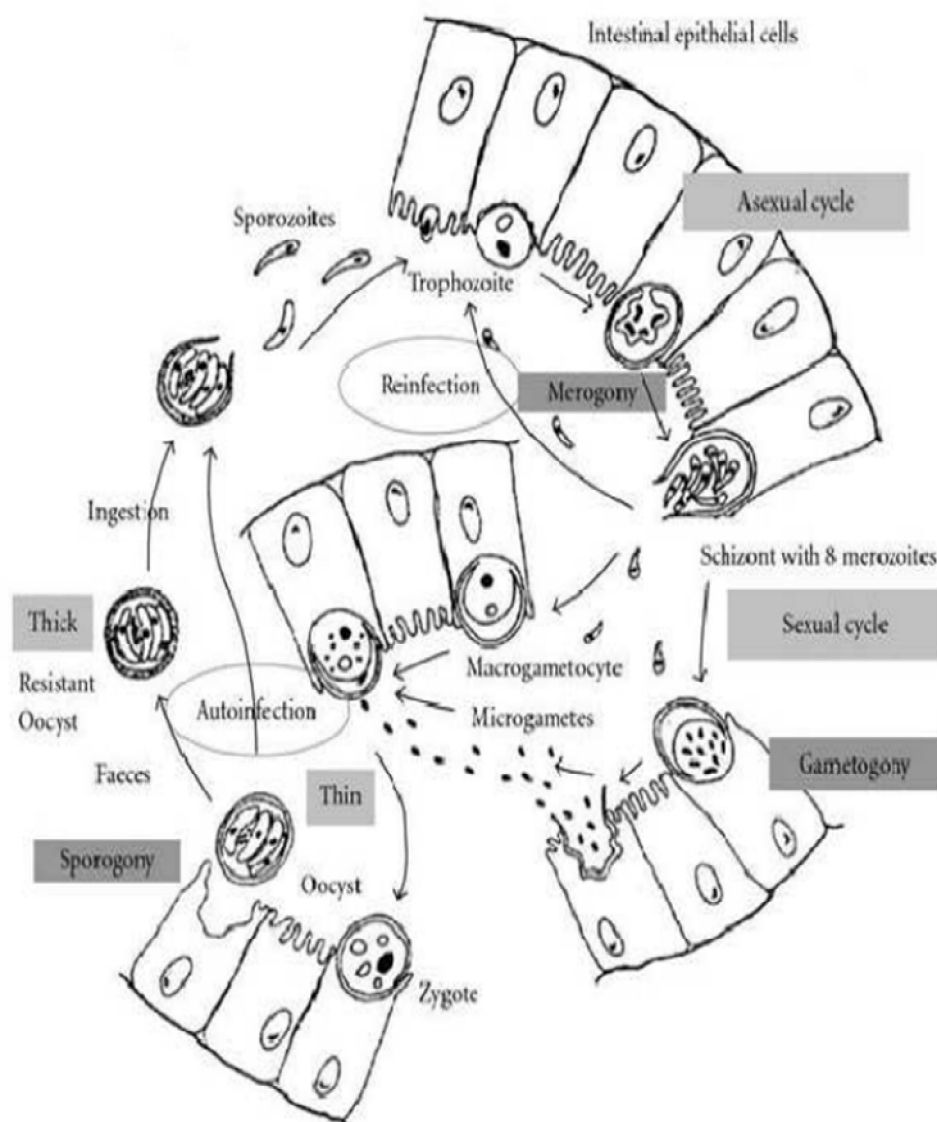


Figure 2: Cycle évolutif de *Cryptosporidium* spp. (Smith *et al.*, 2007)

II.1.3. Systématique

Les cryptosporidies sont des protistes parasites du phylum d'*Apicomplexa* (OIE, 2008) qui est un groupe de parasites qui se caractérisent par la possession, dans certains

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

stades évolutifs de leur vie, de la structure d'invasion parasitaire « le complexe apical » (Fayer, 2007 ; Bouzid *et al.*, 2013 ; Ryan et Xiao, 2014).

Ils appartiennent à la classe de *Conoidasida* qui renferment des espèces munies du complexe apical complet, les cryptosporidies ont été considérés traditionnellement l'un de ces coccidies intestinaux de *Cryptosporidiidae* (De Graaf *et al.*, 1999 ; Fayer, 2007 ; Ryan et Xiao, 2014), famille de l'ordre d'*Eucoccidiorida* (Carey *et al.*, 2004 ; Smith ; 2007), toutefois ils s'en distinguent par l'absence d'apicoplaste et également la présence du stade cellulaire « gamonte-like » extracellulaire qui les font reliée autant aux *grégarines* qu'aux *coccidies* (Fayer, 2007 ; Bouzid *et al.*, 2013 ; Ryan et Xiao, 2014 ; Ryan et Hijjawi, 2015).

La famille de *Cryptosporidiidae* se distingue par le cycle biologique qui est monoxène, la petite taille de ces oocystes qui contiennent à l'intérieur quatre sporozoites nus issus d'une sporogonie entièrement endogène, et leur développement extracytoplasmique à l'intérieur de la cellule hôte (Euzéby, 2008).

Cette famille est représentée par un seul genre, celui de *Cryptosporidium* (Taylor *et al.*, 2007).

Dans ce genre, les caractéristiques phénotypiques (Morphologie et structure des oocyste, spécificité parasitaire) seuls ne peuvent aboutir seules à la classification de ces espèces, c'est grâce à leur structure génétique (Smith, 2007; Thompson et Ash, 2016) que les systématiciens ont arrivé à identifier de nombreux isolats (Espèces).

La caractérisation de certaines séquences d'ADN de ces isolats à déceler une grande diversité génétique au sein du genre *Cryptosporidium* (Ryan et Xiao, 2014). Toutefois, il est représenté actuellement par deux majeurs groupes, celui qui regroupe *C. andersoni*, *C. muris*, *C. serpenti* et *C. galli* et le deuxième regroupe le reste des espèces et les différents sous types de *C. parvum* (Sulaiman *et al.*, 2002 ; Robinson *et al.*, 2010).

Les liens phylogénétiques de ces différents isolats du genre *Cryptosporidium* basées sur l'analyse de la concaténation de séquences nucléotidiques de l'ARNr 18s, de l'actine et de l'HSP70 sont représentés dans la Figure 3. Dans ce schéma, seulement les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% obtenue par neighbour-joining à partir de 1000 répliques sont indiquées.

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

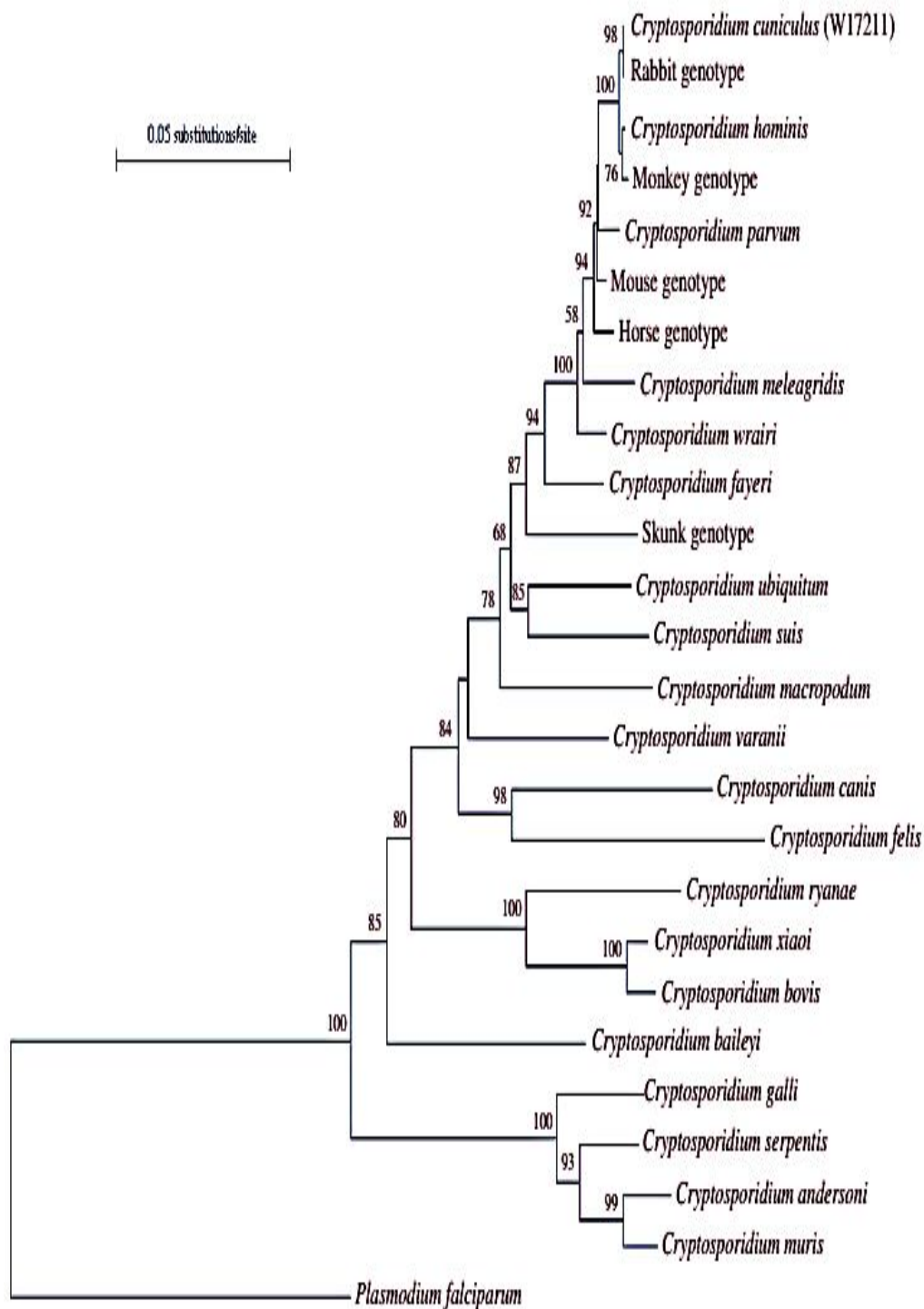


Figure 3: Relations phylogénétiques entre espèces et génotypes de *Cryptosporidium* basées sur l'analyse de la concaténation de séquences nucléotidiques de l'ARNr 18s, de l'actine et de l'HSP70 d'après Robinson *et al.* (2010).

Actuellement on compte d'environ 40 génotypes (OIE, 2008) et 26 espèces dans le genre de *Cryptosporidium*, dont 18 se sont avérés spécifiques aux mammifères (Ryan et

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Xiao, 2014), elles ont été identifiées chez diverses espèces animales domestiques et sauvages ainsi que l'homme.

Cette liste n'est pas exhaustive, le nombre exacte des espèces qui la composent n'est toujours pas totalement établi (Xiao et Feng, 2008 ; OIE, 2008 ; Ryan et Xiao, 2014).

Chez les animaux, à l'exception de *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium ubiquitum* qui sont à large spectre d'hôtes (Smith, 2007, Fayer *et al.*, 2010), il est connue que les espèces de cryptosporidies sont oioxéniques, chaque isolat, espèce ou génotypes, à un hôte particulier. Elles se répartissent selon leur site d'infection en deux grands groupes, celui des espèces intestinales et le groupe des espèces stomacal (Xiao et Feng, 2008). De rares espèces en font l'exception, l'exemple des espèces aviaires *Cryptosporidium baileyi* et *Cryptosporidium galli* qui se localisent au niveau de la trachée, bourse de Fabricius, cloaque, proventricule, rein et poumon (Samuel *et al.*, 2001 ; OIE, 2008 ; Marjit Gabriele Muller, 2010 ; Ryan et Xiao, 2014).

Tableau1: Hôtes et site d'infestations des espèces de *Cryptosporidium* (Xiao et Ryan, 2015)

Espèces	Hôte	Site d'infestation
<i>C. muris</i>	Rongeurs	Estomac
<i>C. parvum</i>	Bovins, ovins, caprins, chevaux, homme	Petit intestin
<i>C. wrairi</i>	Cochons d'Inde	Petit intestin
<i>C. felis</i>	Chats	Petit intestin
<i>C. andersoni</i>	Bovins	Caillette
<i>C. canis</i>	Chien	Petit intestin
<i>C. hominis</i>	Homme	Petit intestin
<i>C. suis</i>	Porcins	Petit et gros intestin
<i>C. bovis</i>	Bovins	Petit intestin
<i>C. fayeri</i>	Marsupiaux	Petit intestin
<i>C. macropodum</i>	Marsupiaux	Petit intestin
<i>C. ryanae</i>	Bovins	Petit intestin

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

<i>C. xiaoi</i>	Ovins	Petit intestin
<i>C. ubiquitum</i>	Ovins, cervidés, rongeurs et primates	Petit intestin
<i>C. cuniculus</i>	Lapins	Petit intestin
<i>C. tyzzeri</i>	Souris	Petit intestin
<i>C. viatorum</i>	Hommes	Petit intestin
<i>C. scrofarum</i>	Porcins	Petit intestin
<i>C. erinacei</i>	Chevaux, hérissons	Petit intestin
<i>C. meleagridis</i>	Oiseaux	Intestin
<i>C. baileyi</i>	Oiseaux	Cloaque, bourse de Fabricius et trachée
<i>C. galli</i>	Oiseaux	Proventricule
<i>C. fragile</i>	Carpeaux	Estomac
<i>C. serpentis</i>	Serpents	Estomac
<i>C. varanii</i>	Lézards	Intestin et cloaque
<i>C. molnari</i>	Poisson	Estomac et intestin

II.2. Etude de *Giardia*

II.2.1. Morphologie et structure

Les espèces de *Giardia* sont des parasites qui affectent les voies intestinales d'un grand nombre d'espèces animales et de l'homme (Thompson, 2004 ; Geurden et Claerebout, 2010).

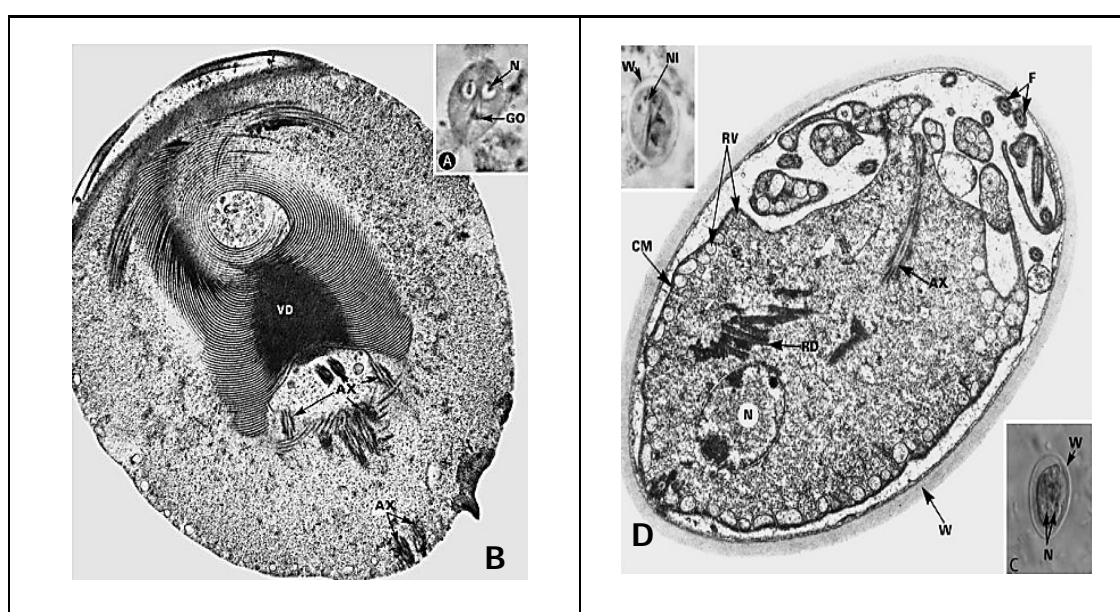
Contrairement aux cryptosporidies ces parasites ne se présentent que sous deux formes seulement au cours de leur vie: Le trophozoïte qui est la forme endogène active et mobile, et le kyste qui constitue le stade exogène quiescent et immobile.

Le trophozoïte à un aspect piriforme avec une extrémité antérieure arrondie et une extrémité postérieure effilée, il ressemble à un cerf-volant lorsqu'on le voit de face. Il renferme 4 paires de flagelles, deux noyaux et deux corps médians symétriquement situés les uns contre les autres par rapport à l'axe central de la cellule qui est l'axostyle (Figure 4), ces formes sont munies aussi d'un disque adhésif sur la partie ventrale de leur corps et

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

qui fonctionne comme une ventouse qui sert à la fixation du parasite sur les cellules intestinales (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Conboy, 1997, Euzeby, 2002 ; Brian, 2005 ; Taylor *et al.*, 2007). La taille du trophozoïte varie de 10 à 20 μm pour la longueur et 5 à 9 μm pour la largeur (Olson et Buret, 2001 ; Taylor *et al.*, 2007) .

Le kyste à une forme ovale, il mesure généralement 4 à 6 μm de large pour 6 à 10 μm de long. Sous microscope le kyste se voit entouré d'une paroi mince et réfringente contenant deux à quatre noyaux selon le stade de sa maturité. Il renferme également des résidus de flagelles et éventuellement deux corps médians comme le montre la figure 4 (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Olson et Buret, 2001 ; Euzeby, 2002).



(A) Trophozoïte vu au microscope optique, (B) Trophozoïte vu au microscope à transmission d'électrons, (C) Kyste vu au microscope optique, (D) Kyste vu au microscope à transmission d'électrons.

VD : Disque ventrale ; **MT** : Microtubules ; **FI** : Fibrilles ; **AX** : Axonème ; **GO** : Appareil de Golgi ; **N** : Noyau ; **W** : Paroi cellulaire ; **RV** : Vacuole de réserve ; **CM** : Membrane cellulaire ; **F** : Flagelle libre ; **RD** : Résidus du disque ventral ; **NI** : Noyau en division

Figure 4: Structure et morphologie du trophozoïte et du kyste de *Giardia* spp. (Mehlhorn, 2008).

II.2.2. Cycle de vie

Le cycle de vie de *Giardia* selon Thompson (2008) est un cycle monoxène et ne comporte que deux stades, le stade d'enkystement et le stade de production des trophozoïtes (Figure 5).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Il se déroule majoritairement à l'intérieur de l'hôte, homme ou animal, qui lorsqu'ils ingèrent les kystes déclenchent son excystation. L'exposition combinée à l'acide dans l'estomac et aux sels biliaires dans l'intestin grêle proximal stimule la libération de trophozoïtes par les kystes, qui se fixent alors à la surface de la muqueuse de l'intestin grêle et la colonisent, puis s'y multiplient rapidement par fission binaire asexuée. Les trophozoïtes dans l'intestin grêle forment progressivement des kystes qui sont éliminés par les fèces et c'est là où commence la phase exogène du cycle.

À l'extérieur ces kystes restent quiescent s'ils trouvent l'humidité et la température favorable à leur maintien dans l'environnement. Ils sont résistants et perdurent longtemps dans l'eau, boues, terre et aliments jusqu'à ce qu'ils seront ingérés par un autre hôte.

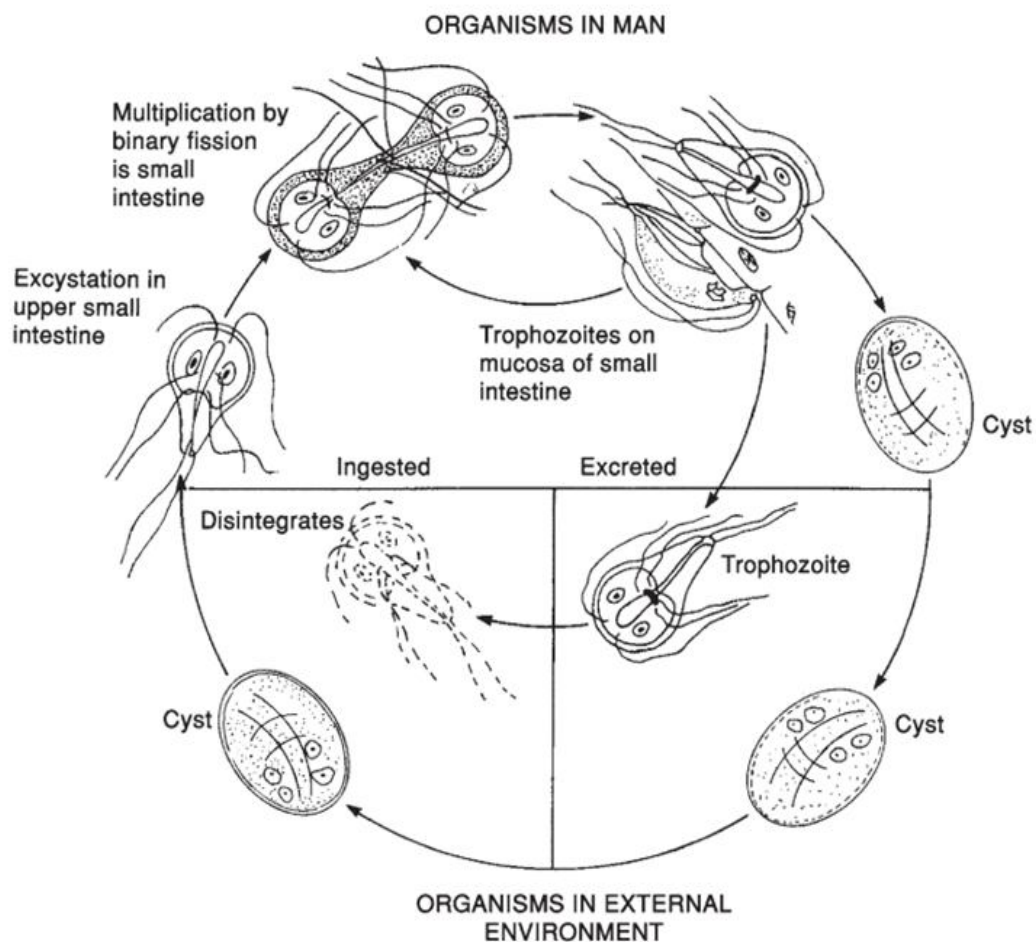


Figure 5: Cycle évolutif de *Giardia intestinalis* (Smith et Paget, 2007).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

II.2.3. Systématique

Les représentants du groupe de *Giardia* sont des plus primitifs eucaryotes trouvés sur terre, on suggère qu'ils ont précocement divergés de cette lignée avant leur acquisition au mitochondrie (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Olson et Buret, 2001 ; Thompson, 2008 ; Plutzer *et al.*, 2010).

Ces protozoaires sont des flagellés du phylum *Sarcomastigophora*, sous-phylum de *Mastigophora*, qui appartiennent à la classe de *Zoomastigophorea*. Ils sont caractérisés par la possession de 4 paires de flagelles, deux noyaux et deux corps medians, caractéristiques qui les tiennent de l'ordre de *Diplomonadida* (Favennec *et al.*, 2006 ; Plutzer *et al.*, 2010). Une autre classification plus récente regroupe les membres de cet ordre dans la classe de *Trepomonadea* du phylum *Metamonada* qui appartiennent à l'empire d'Archezoa, eucaryotes dépourvue de mitochondrie, de plastide, d'hydrogenosomes, de peroxisomes et de l'appareil de Golgi (Smith et Paget, 2007).

Les membres de la famille d'*Hexamitida* possèdent le double de ces organelles qui sont situées symétriquement les unes face aux autres par rapport à l'axe de la cellule (Olson et Buret, 2001 ; Euzeby, 2002 ; Thompson, 2008 ; Plutzer *et al.*, 2010). Cette famille comprend cinq principaux genres mais celui de *Giardia* est le plus important en étant le plus fréquent chez les mammifères (Smith et Paget, 2007 ; Taylor *et al.*, 2007).

La classification en espèces dans ce genre est traditionnellement basée sur des caractéristiques morphologiques, écologiques et structurales selon lesquels six espèces ont été identifiées: *Giardia duodenalis* (Homme, chien, chat, ruminants et mammifères sauvages), *Giardia muris* et *Giardia microti* (Rongeurs), *Giardia agilis* (Amphibiens), *Giardia ardeae* et *Giardia psittaci* (oiseaux) (Olson et Buret, 2001 ; Euzeby, 2002 ; Favennec *et al.*, 2006 ; Plutzer *et al.*, 2010 ; Caccio *et al.*, 2009 ; Ryan et Caccio, 2013).

Mais l'avènement des outils d'identification moléculaire a permis une caractérisation plus affinée qui est aboutie à répertorier un grand nombre d'espèces et de génotypes/ assemblages selon des caractéristiques cette fois ci génétiques (Olson et Buret, 2001 ; Euzeby, 2002 ; Favennec *et al.*, 2006 ; Guerden et Claerebout, 2010). Au sein de l'Assemblage se regroupe les isolats qui présentent une haute similitude génétique, ce sont les isolats possédant le même type de la sous unité 18S. De nombreux Assemblages ont été identifiés, de A à G pour Thompson (2008) et Thompson et Ash (2016) et de A à H selon Feng et Xiao (2011), Ryan et Caccio, (2013) et Heyworth

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

(2016). Les relations phylogénétiques entre ces Assemblages sont indiquées dans la Figure 6.

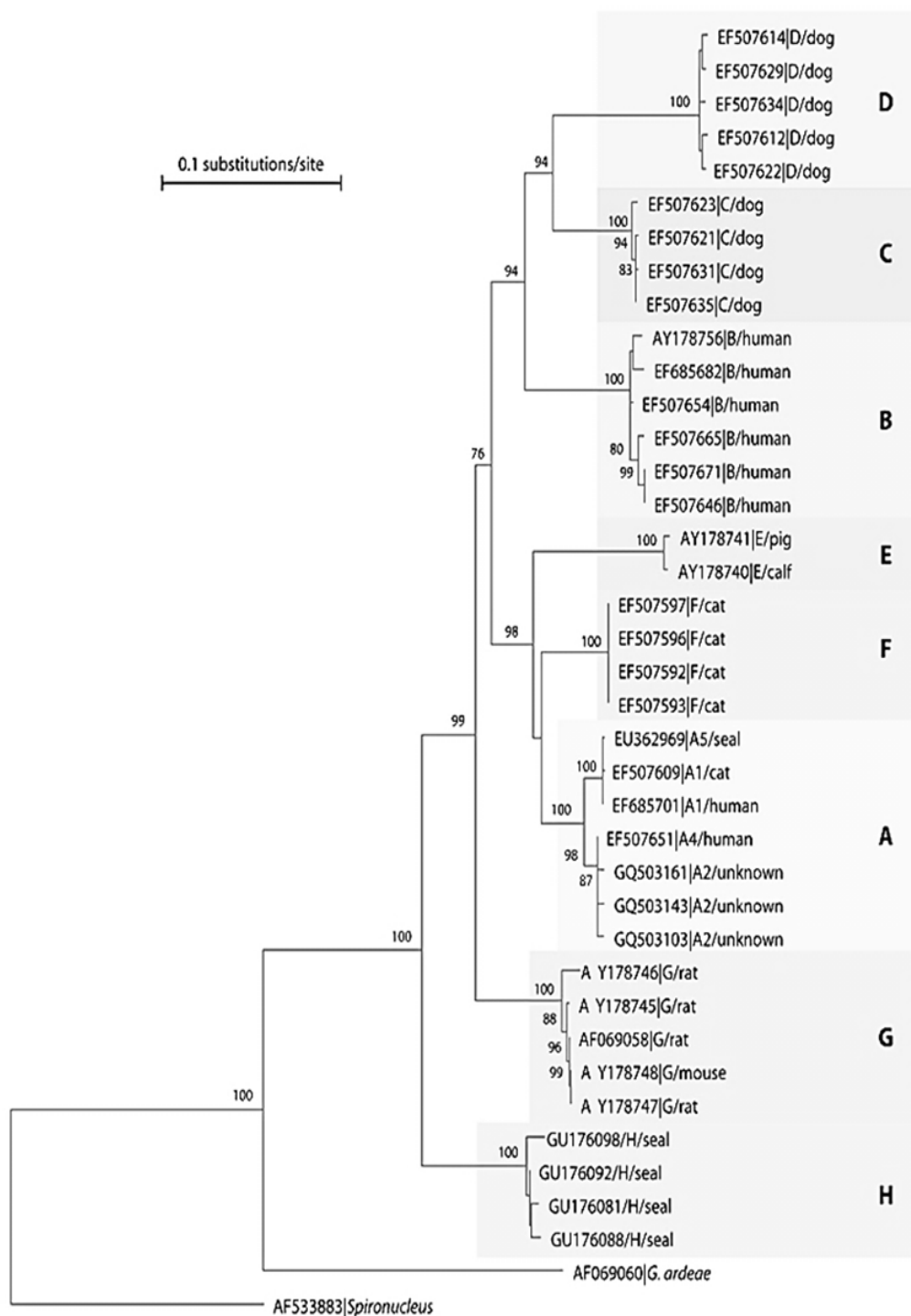


Figure 6: Relations phylogénétique au sein des Assemblages de *G. duodenalis* basées sur l'analyse par neighbor-joining d'une séquence nucléotidique de 709-bp (256 à 964 du GenBank du numéro d'accès AY178740) du gène *gdh* (Feng et Xiao, 2011).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Certains Assemblages/espèces paraissent limitées à des espèces ou types particuliers d'hôtes tandis que d'autres parasitent des hôtes très divers dont l'homme tel sont les assemblages A et B de *G. duodenalis* (Thompson, 2008, Feng et Xiao, 2011) qui sont donc associée à un potentiel zoonotique chez leurs hôtes (Tableau 2). Quelques auteurs donnent des noms spécifiques à chacune des isolats de différents hôtes (Taylor *et al.*, 2007 ; Feng et Xiao, 2011) toutefois cette nomenclature doit être revue, elle devra être confirmée par les données morpho-moléculaires de ces espèces et confrontées au code international de la nomenclature avant leur la validation (Ryan et Caccio, 2013).

Tableau 2: Espèces et /ou Assemblages et hôtes de *Giardia* (Thompson, 2008 ; Ryan et Caccio, 2013)

Espèce/Assemblage	Hôte
<i>Giardia duodenalis</i> /Assemblage A	Humains et autres primates, chiens, chats, bétails, rongeurs et autres mammifères sauvage
<i>Giardia duodenalis</i> / Assemblage B	Homme et primates, chiens et animaux sauvages
<i>G. agilis</i>	Amphibien
<i>G. muris</i>	Rongeurs
<i>G. psittaci</i>	Oiseaux
<i>G. ardeae</i>	Oiseaux
<i>G. duodenalis</i> /Assemblage C et D (<i>G canis</i>)	Chiens
<i>G. duodenalis</i> /Assemblage F (<i>G cati</i>)	Chats
<i>G. duodenalis</i> /Assemblage E (<i>G bovis</i>)	Bétail et autres animaux à sabots
<i>G. duodenalis</i> /Assemblage G (<i>G simondi</i>)	Rats
<i>G. duodenalis</i> /Assemblage H	Mammifères marins

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Une autre espèce, *Giardia varani* a été décrite chez le varan, c'est une espèce similaire à *G. duodenalis*, mais son identité génétique n'est toujours pas clairement démontrée (Feng et Xiao, 2011 ; Ryan et Caccio, 2013).

L'assemblage qui représente un groupe génétique unique s'est avéré lui aussi formé d'un complexe d'isolats génétiquement distincts (Figure 7), ceux qui sont similaires mais non identiques se trouvent dans le même ce qu'on appelle « sub-assemblage » et/ou « génotype ». De nombreux sub-assemblages ont été identifiés notamment dans les deux Assemblage A et B de *Giardia duodenalis* qui est une espèce très hétérogène (Thompson et Ash, 2016 ; Heyworth, 2016) comme illustré dans la figure 7.

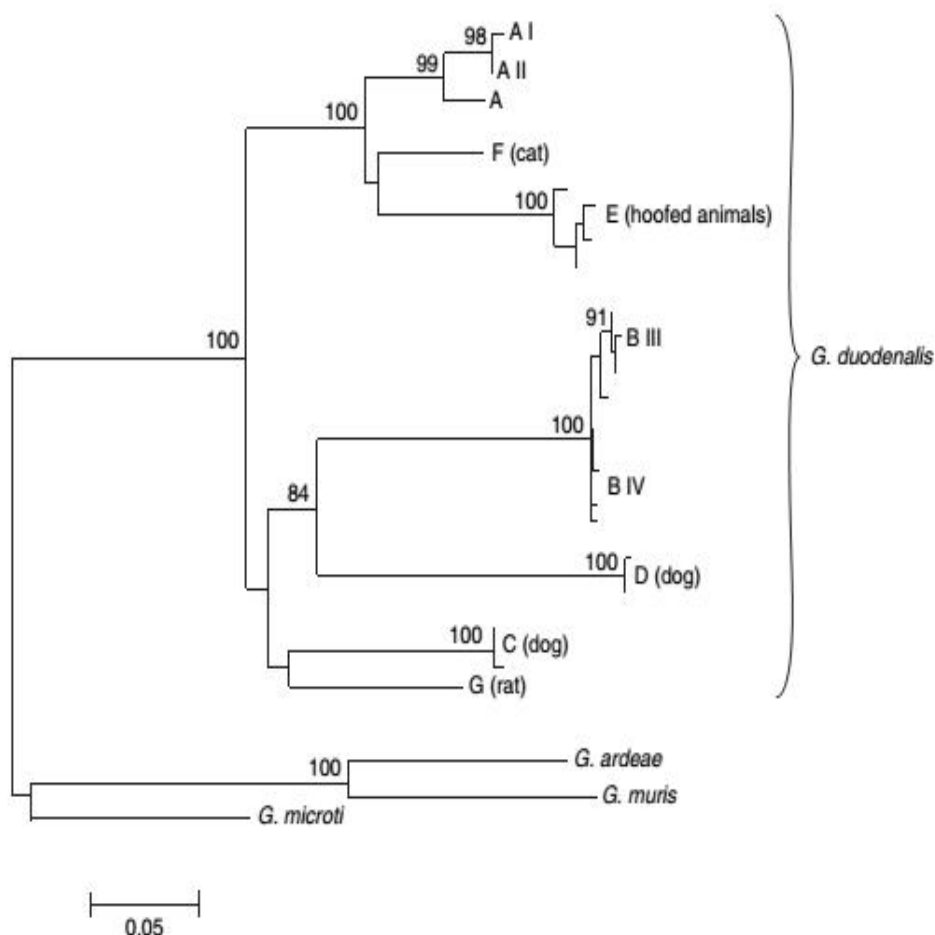


Figure 7: Relations phylogénétique de *Giardia* obtenue par l'analyse de neighbor-joining de la séquence nucléotidique du gène triose phosphate isomérase (*tpi*) avec seules les valeurs de Bootstrap supérieures à 50 sont indiquées, modifiée par Lalle *et al.* (2007)

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Ces sub-assemblages diffèrent non seulement par leur structure génétique mais également par les hôtes qui les parasitent tel est le cas de l'assemblage A qui est subdivisé en quatre génotypes, AI ; AII ; AIII et AIV. Dans cet assemblage seulement le génotype (AI) est doué d'un potentiel zoonotique, il a été isolé à la fois chez les animaux d'élevage et l'homme, les trois autres sont oioxéniques; AII est spécifique aux humains et AIII, AIV, les deux sont retrouvés exclusivement chez les animaux (Feng et Xiao, 2011 ; Ryan et Caccio, 2013).

Du même que pour l'assemblage A, dans l'assemblage B, le plus fréquent chez l'homme, (Favennec *et al.*, 2006 ; Ryan et Caccio, 2013), seulement les génotypes BIII et BIV paraissent spécifiques à l'homme et l'animal alors que les génotypes BI et BII se trouvent le plus souvent chez les animaux (Ryan et Caccio, 2013) .

III. Rôle pathogène

III.1. Expression clinique

III.1.1. Cryptosporidiose

La cryptosporidiose engendre une morbidité et une mortalité élevées en élevage animal associées souvent à des énormes pertes en production (Dixon, 2009 ; Robertson *et al.*, 2014), elle revêt également un grand intérêt médical surtout depuis qu'elle s'est avérée fatale chez les immunodéprimés (Shikani et Weiss, 2014).

La symptomatologie de la cryptosporidiose est variable, elle est liée d'une part à la virulence de l'espèce parasitaire en cause et d'autre part à certains facteurs spécifiques de l'hôte (Fayer *et al.*, 2009; Bouzid *et al.* 2013 ;Caccio et Putigani, 2014) parmi lesquels, le statut immunitaire (Esteban *et al.*, 1998 ; Chalmers et Davies, 2010 ;Caccio et Putignani, 2014) l'âge et le site d'infection (Tzipori et Ward, 2002 ; Chalmers et Davies, 2010) comptent considérablement. La fréquence d'exposition de l'hôte au parasite semble aussi favorisante de la maladie (Bouzid *et al.*, 2013).

III.1.1.1. Cryptosporidiose animal

Chez les animaux d'élevage, la morbidité ainsi que les symptômes de la cryptosporidiose varient d'une espèce à l'autre et même entre les individus de la même espèce, allant de la forme aiguë, subaiguë voire asymptomatique.

La diarrhée est le symptôme le plus fréquent. Dans les épisodes aigus, cette diarrhée est plus au moins muqueuse et nauséabonde, elle s'accompagne d'une forte

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

excrétion des oocystes, notamment chez les jeunes (De Graaf *et al.*, 1999 ; Zhu et Abrahamsen, 2004 ; Raccurt, 2007 ; OIE, 2008 ; Veronesi *et al.*, 2009) chez lesquels la maladie peut évoluer vers la mort dans certaines conditions (De Graaf *et al.*, 1999 ;Samuel *et al.*, 2001 ; Enmark *et al.*,2003).

En plus de la diarrhée, d'autres signes non spécifiques peuvent s'observer chez l'animal comme de l'anorexie et l'amaigrissement qui en résultent un retard de croissance durant les premières semaines de vie chez les jeunes animaux (Samuel *et al.*, 2001 ; Enmark *et al.*, 2003 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Robertson *et al.*, 2014). La fièvre, la dépression, les douleurs abdominales et l'apathie avec une dégradation de l'état générale de l'animal sont des signes qui ont été aussi signalés au cours de la cryptosporidiose aigue chez certains sujets animaux (Robertson *et al.*, 2014).

Bien que la cryptosporidiose animale touche principalement les nouveau-nés (Chalmers et Casemore, 2004) le développement du parasite chez l'adulte a été aussi rapporté, toutefois il ne s'accompagne pas de symptômes sévères, elle affecte la production et réduit l'état corporel de l'animal, la maladie donc est sub-clinique, elle peut être asymptomatique (Robertson *et al.*, 2014) où seul l'excrétion des oocystes infectants autour de la période périnatale peut la révéler (De Graaf *et al.*, 1999 ; OIE, 2008 ; Paraud et Prunet, 2012).

En réalité la symptomatologie de la cryptosporidiose est liée à l'espèce de cryptosporidie en cause. *C. parvum* est l'espèce la plus pathogène, elle y est associé la cryptosporidiose aigue chez les ruminants, si on la compare à *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. xiaoi* dont la symptomatologie est souvent sub-clinique ou asymptomatique. Du même, *C. ubiquitum* chez les petits ruminants est isolé chez certains animaux diarrhéiques et *C. andersoni* chez les bovins peut engendrer la maldigestion et compromettre la production lacté chez ceux-ci (Santin et Trout, 2007 ; Robertson *et al.*, 2014).

III.1.1.2. Cryptosporidiose humaine

La maladie chez l'homme se manifeste essentiellement par une diarrhée souvent profuse, rarement sanglante (Chalmers et Davies, 2010) avec des douleurs abdominales (Certad *et al.*, 2017).

D'autres symptômes y sont associés, cela comprends fréquemment des vomissements, des nausées, et une fièvre modérées et occasionnellement des myalgies, de

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

l'anorexie, des maux de tête et de la fatigue (Chalmers et Davies, 2010 ; Ridley, 2012; Bouzid *et al.*, 2013 ; Caccio et Putignani, 2014 ; Certad *et al.*, 2017) .

Ces symptômes sont spontanément résolus au cours de 2 à 3 semaines chez les immunocompétents chez lesquels ils peuvent être parfois complètement absents. Toutefois les enfants et les vieillards en sont fréquemment et sévèrement touchés (Chalmers et Casemore , 2004 ; Carey *et al.*, 2004 ; Chalmers et Davies, 2010 ; Caccio et Putignani, 2014 ; Shikani et Weiss, 2014), ils peuvent manifester de la diarrhée pendant plus d'un mois dans certains cas (Tzipori et Ward, 2002 ; Carey *et al.*, 2004 ; Caccio et Putignani, 2014).

Contrairement aux immunocompétents, la cryptosporidiose chez les immunodéprimés peut être fatale qu'elle soit dans sa forme intestinale ou extra intestinale (Chalmers et Casemore , 2004 ; Carey *et al.*, 2004 ; Chalmers et Davies, 2010 ; Bouzid *et al.*, 2013).

Pour certaines espèces de *Cryptosporidium*, la maladie peut même avoir des séquelles pour une période beaucoup plus prolongée qui sont essentiellement des maux de tête, des douleurs oculaires, la fatigue et une perte d'appétit et éventuellement des douleurs articulaires (Chalmers et Davies, 2010 ; Bouzid *et al.*, 2013 ; Caccio et Putignani, 2014 ; Certad *et al.*, 2017). C'est d'autant plus fréquent lorsque *C. hominis* est en cause de la cryptosporidiose (Kortbeek, 2009).

III.1.2. Giardiase

La giardiase est une pathologie sévissant chez l'homme et l'animal un peu partout dans le monde. Bien qu'elle soit commune, la plupart des sujets atteints restent toutefois asymptomatiques, en tous cas la symptomatologie de la giardiase est variable, elle est liée à la souche, l'environnement (fréquence de la transmission) et la réaction immunitaire mise en jeu par l'organisme hôte (Thompson, 2008 ; Guerden et Claerebout, 2010).

III.1.2.1. Giardiase animale

La maladie chez l'animal est rarement associée à des symptômes cliniques, de plus les infestations graves sont exceptionnelles chez les ruminants (Thompson, 2004 ; Shakespeare, 2009 ; Heinz, 2016) mais quand elle s'exprime elle engendre une diarrhée muqueuse, des douleurs abdominales, déshydratation et léthargie, en particulier chez les jeunes (Olson et Buret, 2001 ; Sweeny *et al.*, 2011) dans la phase aiguë, ou une diarrhée

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

intermittente avec perte de poids et/ou retard de croissance dans la phase chronique. Quelquefois elle peut être fatal, et cela a été signalé chez les oiseaux et chinchillas (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Olson et Buret, 2001 ; Shakespeare, 2009 ; Sweeny *et al.*, 2011). Des réactions allergiques associées à la maladie ont été également observées chez différentes espèces animales (Olson, 2002).

La giardiase aigüe est moins commune chez l'animal, elle est souvent d'allure chronique notamment chez les adultes des animaux d'élevage (Thompson, 2004 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Guerden et Claerebout, 2010) chez lesquels seule la sécrétion des kystes peut l'indiquer. Ils sont présents avec une faible intensité dans les fèces, toutefois leur sécrétion peut s'intensifier chez les femelles autour de la mise-bas (Olson et Buret, 2001 ; Guerden et Claerebout, 2010).

L'expression clinique de la maladie varie considérablement entre espèces animales et individus de la même espèce (Guerden et Claerebout, 2010), elle est plus sévère chez les individus dont le statut physiologique, nutritif ou immunitaire sont compromis (Thompson, 2009). De plus, la diarrhée s'exprime surtout chez les veaux alors que chez les agneaux et les chevreaux, elle se révèle seulement par l'aspect des selles qui sont plus au moins formolées, mais quant à l'effet sur la production, ces deux dernières espèces d'élevage semble plus vulnérables, elle est à l'origine des réductions des masses des carcasses chez ceux-ci et les pertes en poids chez les jeunes de ces animaux (Thompson, 2009 ; Guerden *et al.*, 2010 ; Sweeny *et al.*, 2011).

III.1.2.2. Giardiase humaine

Chez l'homme, la giardiase est souvent asymptomatique aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant, chez lequel elle évolue le plus vers la chronicité (Favennec *et al.*, 2006 ; Thompson, 2009).

Chez les sujets symptomatiques, la maladie commence par un malaise, et de l'anorexie qui s'associe aussitôt à une brève diarrhée muqueuse et nauséabonde, cette diarrhée devient pâteuse, grasseuse et inoffensive au bout de quelques jours (Brian, 2005 ; Favennec *et al.*, 2006 ; Thompson, 2008 ; Shakespeare, 2009).

A ces symptômes s'ajoute fréquemment des douleurs épigastriques, nausées, flatulence, vomissements et une perte de poids accompagnant les épisodes diarrhéiques (Thompson, 2009 ; Certad *et al.*, 2017).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Dans la majorité de cas l'infestation disparaît spontanément dans les 2 à 4 jours qui suivent la primo infestation, toutefois des accès diarrhéiques récurrents peuvent persister pendant longtemps lorsque la giardiase passe à la chronicité (Thompson, 2008 ; Thompson, 2009 ; Shakespeare, 2009 ; Certad *et al.*, 2017).

La giardiase chronique est responsable d'un syndrome de malabsorption qui se traduit par une perte de poids qui peut être sévère particulièrement chez l'enfant où elle occasionne une cassure de la courbe du poids et une baisse des fonctions cognitives (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Favennec *et al.*, 2006 ; Brian, 2005 ; Thompson, 2008 ; Shakespeare, 2009 ; Certad *et al.*, 2017).

Urticaire et des dermatites atopiques sont des manifestations allergiques qui ont été rapportés dans certains cas de giardiase, et cela mêmes chez les sujets asymptomatiques (Olsen et Buret, 2001 ; Favennec *et al.*, 2006 ; Geurden et Claerebout, 2010).

Les deux assemblages, A et B de *G. intestinalis* isolés chez les humains semblent avoir la même expression clinique toutefois et contrairement à la symptomatologie, la durée de la giardiase est différente chez les sujets immunocompétent selon que le parasite soit de l'assemblage A ou B (Cotton *et al.*, 2011).

III.2. Pouvoir pathogène

L'entrée du parasite chez l'hôte induit une série de réactions dont les mécanismes par lesquels les deux pathogènes engendrent la maladie restent en grande partie mal comprises. Physiologiquement l'expression clinique des deux parasitoses, cryptosporidiose et giardiase, est un processus multifactoriel qui dépend des facteurs liés à la fois aux parasites et de leurs hôtes (Favennec *et al.*, 2006).

Ce processus commence par l'attachement du parasite à la surface de la cellule hôte qui est non seulement un stimuli du mécanisme pathologique mais également l'un des facteurs qui détermine la virulence parasitaire chez l'hôte (Certad *et al.*, 2017). Cet attachement induit la réorganisation et la perturbation du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales et les jonctions qui les relie, ce qui en résulte une atrophie des villosités associée ou non à un raccourcissement diffus des microvillosités. D'autres lésions cellulaires ont été également rapportées à l'exemple de l'hyperplasie des cryptes qui se produit au cours de la cryptosporidiose (Favennec *et al.*, 2006 ; Thompson, 2008 ; Geurden et Claebout, 2010 ; Cotton *et al.*, 2011 ; Certad *et al.*, 2017).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

De toute façon, le remaniement de l'architecture de la membrane épithéliale intestinale accroît la perméabilité et altère la surface ainsi que la fonction d'absorption de l'intestin pour l'eau, les électrolytes et certains nutriments, essentiellement les disaccharides dans le cas de *Giardia* et les monosaccharides et les amino-peptides dans le cas de *cryptosporidium*. La sécrétion excessive des cellules épithéliales et l'accumulation des nutriments, électrolytes et fluides à l'origine d'un syndrome de malabsorption-maldigestion justifient la diarrhée et les pertes en poids lors de l'expression clinique de ces parasitoses (Olson et Buret, 2001 ; Geurden et Claebout, 2010 ; Okhuysen et Chappell, 2002).

Il y a entre autre un processus inflammatoire qui exacerbe les deux mécanismes d'excrétion et d'absorption dont les acteurs sont les cellules immunitaires de l'organisme hôte suite à leur stimulation par les cytokines de sa muqueuse intestinale. Cette réaction immunitaire est considérable face aux cryptosporidies, mais dans l'infestation par *Giardia* elle semble absente (Cotton *et al.*, 2011 ; Certad *et al.*, 2017) car ce parasite est doué d'un système d'évasion performant (Buret et Cotton, 2011) . En effet, il a été montré que la giardiose prends une allure chronique, en absence de lymphocyte T dans les mécanismes de défense immunitaire contre *Giardia* (Favennec *et al.*, 2006), par contre les réactions allergiques qui y sont associées, elle sont dues à l'hyperplasie des mastocytes intestinales et cutanées qui migrent vers le site d'infection au cours de la réaction immunitaire, une hyperplasie qu'on suggère être provoquées par la sensibilité de l'hôte aux aliments et/ou protéines parasitaires (Olson et Buret, 2001 ; Buret et Cotton, 2011).

En outre, on pense qu'une production excessive des prostaglandines durant la réaction immunitaire induite par *C. parvum* est suspecte également dans la fonction défectueuse de la barrière intestinale (Okhuysen et Chappell, 2002 ; Carey *et al.*, 2004).

Un autre facteur de virulence est lié à la capacité du parasite à induire l'apoptose de la cellule hôte. Ce phénomène est en grande partie en cause de la détérioration des jonctions cellulaires par le parasite du genre *Giardia*. Les cryptosporidies ont également ce pouvoir à moduler l'expression génomique de leur hôtes, néanmoins, et contrairement à *Giardia*, l'apoptose est complètement freinée au stade trophozoite, elle n'est active qu'aux deux stades sporozoite et merozoite (Certad *et al.*, 2017).

Le pouvoir lytique que possèdent certaines molécules parasitaires a été aussi incriminé dans la défiance cellulaire au cours du mécanisme pathologique de la

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

cryptosporidiose par des phospholipases, des protéases et une hémolysine. Alors que pour *Giardia*, l'implication d'une enterotoxine au cours du mécanisme physiopathologique chez l'hôte demeure à nos jours débattue (Geurden *et al.*, 2010 ; Cotton *et al.*, 2011 ; Certad *et al.*, 2017).

VI. Epidémiologie

VI.1. Répartition et prévalence

VI. 1.1. Répartition

VI.1.1.1. Répartition en fonction de la situation géographique

Les parasites des deux genres, *Giardia* et *Cryptosporidium*, présentent une large répartition mondiale aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Olson et Buret, 2001 ; Chappell *et al.*, 2003 ; Sulaiman et Cama, 2006). Les travaux de la littérature confirment leur existence dans l'ensemble des continents à l'exception de l'Antarctique (Duszynski et Upton, 2001 ; Fayer, 2003; Kutz *et al.*, 2009 ; Palacios *et al.*, 2010).

Cependant, la répartition des espèces et/ou des génotypes de *Giardia* et *Cryptosporidium* diffèrent considérablement d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre et même dans le même pays. Chez les animaux d'élevage, *C. parvum* semble l'espèce la plus fréquemment isolée en Europe alors que dans le reste du monde c'est *C. ubiquitum* qui domine (Robertson, 2009). Il n'y a pas que *C. parvum* qui prédomine en Europe, *C. xiaoi*, elle aussi, elle est de plus en plus repérée actuellement dans les élevages animaux dans de nombreux pays européens (Rieux *et al.*, 2013).

Il en est du même que pour l'animal, *C. parvum* est plus répandu chez l'homme en Europe et même en moyen-Orient, tel récemment démontré par Robertson (2015) avec une nette prédominance dans les régions rurales. Dans les autres continents, essentiellement des pays sous-développés *C. hominis* est le plus en extension (Robertson, 2009 ; Robertson, 2015 ; Xiao et Feng, 2011) à côté de *C. ubiquitum* dont le nombre de cas augmentent actuellement aussi dans les pays industrialisés (Fayer *et al.*, 2010 ; Xiao et Ryan, 2015). Dans certaines régions du globe, les cas humains à *C. meleagridis* sont assez importants que les cas à *C. parvum* (Caccio et Putigani, 2014) alors que dans d'autres, *C. canis* et *C. felis* paraît également causal de la cryptosporidiose chez l'homme, mais ces observations concernent surtout les pays industrialisés (Robertson, 2009).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Les espèces de *Giardia* chez les ruminants ont une distribution quasi-totale dans le monde (Heinz, 2016), contrairement à celle de ses assemblages au travers, qui présente une grande variabilité d'une région à l'autre. En effet les études montrent que l'assemblage E est le plus répartis chez les animaux d'élevage (Robertson, 2009 ; Caccio, 2015), mais les deux assemblages A et B sont vraisemblablement assez fréquents, au moins dans les pays européens d'après Caccio (2015).

L'Assemblage A a été isolé avec de fortes intensités (43%) en Allemagne, Royaume-Uni, France et Italie et dans de nombreux pays pour les deux espèces, ovine et caprine.

Bien qu'il soit moins communément identifié chez les animaux de bétail, l'assemblage B a été aussi déclaré un peu partout dans le monde, notamment en Chine et la Nouvelle-Zélande chez le bovin et dans la Chine, Norvège, Italie et l'Espagne chez les petits ruminants (Caccio, 2015).

Chez l'homme, les cas de giardiose dans le monde sont dus davantage aux Assemblages A et B qui sont souvent en fait de sous-assemblages I et II pour le premier. D'autres assemblages ont été isolés chez les humains notamment dans les pays sous-développés (Caccio, 2015)

VI.1.1.2. Répartition en fonction de l'espèce d'élevage

Chez les animaux, ces deux parasites ont été repérés chez diverses espèces sauvages et domestiques avec de fortes intensités observées notamment chez les ruminants (Duszynski et Upton, 2001, Olson et Buret, 2001 ; Thompson, 2004 ; Hamnes *et al.*, 2007 ; Castro- Hermida *et al.*, 2007a ; Guerden et Claerebout, 2010).

Pratiquement *C. parvum* est une espèce qui présente une large gamme d'hôtes, elle est la plus impliquée dans la morbidité et la mortalité des jeunes animaux avant le sevrage. Les infestations à *C. parvum* représentent d'environ 80 % des cas recensés chez les veaux (Fayer et Xiao, 2007 ; Robertson *et al.*, 2014) et probablement le seul à isoler chez les petits ruminants en Europe (Robertson, 2009 ; Rieux *et al.*, 2013 ; Robertson *et al.*, 2014). Au-delà de sevrage d'autres espèces ont été identifiés chez les animaux d'élevage, qui diffèrent non seulement par leur spécificité mais aussi par leur dynamique d'évolution en fonction de l'âge. *C. bovis* et *C. ryanae* sont communément isolées chez les veaux de 2 à 11 mois (Fayer *et al.*, 2009, Ryan et Xiao, 2009 ; Rieux *et al.*, 2013)

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

puis *C. andersoni* prend le relais chez les veaux plus âgés ainsi que les adultes, dans le cas du bovin (Fayer *et al.*, 2009, Ryan et Xiao, 2009 ; Rieux *et al.*, 2013). Pour l'ovin et le caprins, les études montrent que *C. xiaoi* et *C. ubiquitum* sont plus prévalent chez les post sevrés et les adultes (Robertson *et al.*, 2014), ces deux même espèces ont été également isolées chez les jeunes des petits ruminants (Rieux *et al.*, 2013 ; Kaupke *et al.*, 2017).

Des génotypes inattendus ont été sporadiquement trouvées chez chacune des trois espèces animales, l'exemple de *C. felis*, *C. hominis*, *C. scrofarum*, *C. serpentis*, *C. suis* et *C. suis-like* génotype chez le bovin (Fayer *et al.*, 2009) et *C. hominis*, *C. suis*, *C. andersoni* et *C. fayerii* chez l'ovin (Robertson *et al.*, 2014, Ryan et Xiao, 2009).

Les infestations dues à *Giardia* chez les animaux d'élevage sont majoritairement liées au génotype E qui est en fait exclusivement animal mais les génotypes zoonotiques A et avec un moindre degré le B ont été également déclarés pareillement chez les trois espèces d'élevage (Thompson, 2004 ; Robertson, 2009 ; Geurden et Olson, 2011 ; Ryan et Caccio, 2013). Mais il semble qu'il y a un peu plus de cas à l'Assemblage A chez le bovin que chez l'ovin et le caprin (Feng et Xiao, 2011). Pour certains, le génotype A intervient dans un âge plus précoce (<8 semaines) au moment où le génotype E paraît le plus fréquent chez les animaux plus âgés (Feng et Xiao, 2011 ; Ryan et Caccio, 2013).

VI.1.2. Prévalence

Pour les cryptosporidies, les données chiffrées présentent une nette prédominance chez les bovins et les caprins comparativement aux ovins chez lesquels la prévalence varie de 0 à 77 % au maximum alors que pour les deux autres espèces d'élevage, cette prévalence peut atteindre 100 % (Robertson *et al.*, 2014).

Quant aux parasites du genre *Giardia*, Robertson (2009) indique que sa prévalence change de plus de 10 à 40 % chez l'ovin et le caprin. Chez le bovin des prévalences variables ont été rapportés cependant les résultats des études de sa fréquence donnent des valeurs comprises entre 73 et 93 % (Dixon, 2009 ; Geurden *et al.*, 2010 ; Geurden et Olson, 2011 ; Ryan et Caccio, 2013).

VI.2. Sources de contamination et modes de transmission

La contamination par ces deux parasites est de type oro-fécale, elle s'effectue directement par l'ingestion des formes quiescentes au moment du léchage du pelage ou du laine, de la literie et du matériel d'élevage souillés (Delafosse, 2003 ; Geurden et Olson,

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

2011 ; Bordoiseau *et al.*, 2013), ou indirectement lors de la consommation d'aliment ou d'eau contenant les formes infectantes (Caccio *et al.*, 2009 ; Plutzer *et al.*, 2010 ; Dixon, 2009, Geurden et Olson, 2011).

Ainsi, l'environnement présente une source potentielle de contamination, les parasites y sont très résistants, ils peuvent survivre à l'extérieur pour de nombreuses semaines (Geurden *et al.*, 2010 ; Geurden et Olson, 2011) voire des mois dans l'eau et le sol humide (Olson, 2002 ; Radostits *et al.*, 2006 ; Dixon, 2009 ; Plutzer *et al.*, 2010 ; Ryan et Caccio, 2013). Ces parasites résistent également à une grande gamme des désinfectants usuels (Tzipori et Ward, 2002, Fayer et Xiao, 2007) ce qui entretient l'infection dans les locaux d'élevage (Delafosse *et al.*, 2003) et les sources d'eau de l'animal (Xiao, 1994), toutefois ils demeurent sensibles à la sécheresse, la congélation (-20 C) et certains désinfectants puissants tel que l'ammonium quaternaire, l'Ozone et les halogènes désinfectants tel les deux ,dioxyde d'hydrogène et dioxyde de chlore (Olson, 2002 ; Radostits *et al.*, 2006 ; Fayer et Xiao, 2007 ; Geurden et Claerebout, 2010 ; Geurden et Olson, 2011 ; Bordoiseau *et al.*, 2013).

De plus, les rayons solaires ont été évoqués comme moyen d'inactivation des formes quiescentes d'autant plus que la température soit élevée (Liu *et al.*, 2015), hypothèse émanant des essais de désactivation des oocystes de *Cryptosporidium* ainsi que des kystes de *Giardia* par les rayons UV dans l'expérimentation (Olson et Buret, 2001 ; Olson, 2002 ; Karanis *et al.*, 2003).

Mais l'environnement n'est pas seul à transmettre le parasite, les formes émises dans les fèces des jeunes animaux malades sont incriminées davantage dans la transmission de ces parasites (Dixon, 2009 ; Geurden et Olson, 2011) en raison de leur forte prévalence et la forte excrétion parasitaire (Xiao, 1994 ; Delafosse *et al.*, 2003). Toutefois les adultes, même à bas niveau d'excrétion peuvent jouer le rôle de réservoir du parasite pour les jeunes et contribuer donc à la dissémination des parasites dans l'environnement (Olson et Buret, 2001 ; Tzipori et Ward, 2002 ; Geurden et Olson, 2011).

La transmission inter-espèce est également établie. Une transmission croisée des oocystes et/ou des kystes des veaux vers les agneaux et vice versa a été signalée à plusieurs reprises (Xiao, 1994 ; Olson et Buret, 2001 ; Xiao et Feng, 2008 ; Baroudi *et al.*, 2011).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

En outre, les mouches et les rongeurs présents dans les locaux d'élevage peuvent contribuer autant à la transmission du parasite (De Graaf *et al.*, 1999 ; Bajer, 2008 ; Thompson, 2008 ; Zhao *et al.*, 2014).

VI.3. Facteurs prédisposants

L'infestation se maintient à la faveur de certains facteurs liés à l'animal (Age et statut immunitaire) et d'autres à l'environnement (Saison, nombre de naissances, densité des animaux dans les bâtiments,...etc.). Ces facteurs agissent différemment d'une région à l'autre à cause de la variation de la gestion des troupeaux dans les différentes parties du monde.

VI.3.1. Facteurs intrinsèques

De nombreux travaux ont montré que le jeune âge est un facteur de risque majeur (Olson, 2002, Dixon, 2009) dans l'infestation. L'infestation s'observe depuis les premières semaines voire jours de vie chez l'animal (Xiao, 1994 ; Delafosse *et al.*, 2003 ; Ouchene *et al.*, 2014), elle devient néanmoins moins fréquente au fil de l'âge chez l'animal (Noordeen *et al.*, 2001). Et pourtant le portage des parasites à l'âge adulte est également confirmé, il survient principalement chez les femelles autour du mise-bas (Castro-Hermida *et al.*, 2005a).

Le système immunitaire peu performant de ces animaux est en cause de leur sensibilité à ces parasites, les jeunes sont neufs sur le plan immunologique, dès que la maturation immunitaire s'acquiert, l'animal devient résistant (Olson et Buret, 2001 ; Geurden et Olson, 2011) c'est ainsi que l'infestation devient de plus en plus moins fréquente à l'âge adulte. Le corollaire de ces données serait que toute diminution de l'immunité, par le stress (péri-sevrage), une maladie intercurrente ou une alimentation inadéquate, pourrait être un facteur de risque pour ces parasitoses (Olson et Buret, 2001 ; Duszynski et Upton, 2001 ; Taylor *et al.*, 2007).

VI.3.2. Facteurs extrinsèques

Certains auteurs impliquent d'autres facteurs où ils notent notamment l'effet de la saison. C'est au printemps et l'automne et pour d'autres l'hiver et le printemps (Bourgoïn, 1996 ; De Graaf *et al.*, 1999 ; Duszynski et Upton, 2001 ; Delafosse *et al.*, 2003 ; Akam *et al.*, 2007 ; Bajer, 2008), que les infestations à *Cryptosporidium* et/ou *Giardia* seront les plus intenses chez les animaux.

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Cependant ce résultat est à moduler en fonction du nombre de naissance et du mode d'élevage. Certains relient les variations de la prévalence de ces deux parasites au cours de l'année à la période de naissance (Agnelage, chevrotage et vêlage) qui coïncide avec les saisons qui paraissent les plus à risque (Duszynski et Upton, 2001 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Khelef *et al.*, 2007), où l'excrétion parasitaire serait maximale. Donc la dissémination des parasites est plus favorable essentiellement chez les jeunes animaux qui se trouvent en promiscuité. Ce risque augmente d'autant plus si l'élevage est intensif (Delafosse *et al.*, 2003 ; Akam *et al.* , 2007 ; Guerden et Claerebout., 2010 ; Geurden et Olson, 2011) où la surpopulation et le taux d'humidité sont trop élevés (De Graaf *et al.*, 1999 ; Caccio *et al.*, 2009). Cependant l'infection dans les box individuelles a été également démontrée (Geurden et Olson, 2011).

L'alimentation, la taille des cheptels et le rapport mère-jeune sont aussi des facteurs de risque qui ont été relevés comme ayant un impact sur l'infestation des animaux par les cryptosporidies. Néanmoins il semble que l'effet du rapport mère-jeune est minime devant la contamination résiduelle des locaux des jeunes (Delafosse *et al.*, 2003 ; Akam *et al.*, 2007).

En outre, le climat et les pratiques d'élevage comptent également dans la variation de la fréquence de ces deux parasites chez les animaux d'élevage à travers les différentes fermes, régions, pays et périodes enquêtés (Xiao, 1994 ; Delafosse *et al.*, 2003; Guerden et Claerebout ., 2010 ; Baroudi *et al.*, 2011).

Et enfin, le risque d'infestation par *Cryptosporidium* et/ou *Giardia* chez les animaux d'élevage augmentent aussi lorsque les conditions sanitaires et d'hygiène sont dégradées (Delafosse *et al.*, 2003 ; Khelef *et al.*, 2007 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Baroudi *et al.*, 2011 ; Sudré *et al.*, 2012).

V. Diagnostic

Comme pour l'ensemble des parasites intestinaux, les espèces de *Giardia* et *Cryptosporidium* peuvent être détectées par de multiples méthodes de diagnostic qui reposent sur la mise en évidence des éléments parasitaires essentiellement dans la matière fécale (formes quiescentes ou végétatives, antigène, génome).

L'examen microscopique qui constitue la pierre angulaire du diagnostic biologique des parasitoses (Chalmers, 2009 ; Van den Bossche *et al.*, 2015) demeure le

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

plus spécifique dans l'identification de ces deux parasites bien que d'autres méthodes, immunologiques et moléculaires, ont montré une sensibilité nettement supérieure (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Behr *et al.*, 1997 ; Suliaman et Cama, 2006 ; Elsafi *et al.*, 2013 ; Gotfred-Rasmussen *et al.*, 2016).

V.1. Méthodes coproscopiques

Ces méthodes consistent à repérer les parasites dans la matière fécale directement à l'état frais ou après coloration par l'observation à l'aide d'un microscope. Elles sont les plus souvent associées à un enrichissement préalable pour optimiser l'efficacité de la procédure (Chalmers, 2009 ; Smith et Paget, 2007 ; Ridley, 2012).

Différentes méthodes de diagnostic coproscopiques sont disponibles pour les deux parasites, dont le choix est déterminé par l'objectif de l'étude, l'hôte duquel ont été issus et les moyens mis à la disposition du laboratoire

V.1.1. Examen microscopique sans coloration

V.1.1.1. Examen direct sans enrichissement

Cet examen permet la mise évidence à la fois des formes kystiques et végétatives dans une portion réduite de matière fécale fraîche après l'avoir émulsifiée dans une solution salée. L'addition d'une solution d'iode (Lugol) augmente la sensibilité de cet examen car il accroît le contraste des organites cellulaires et permet donc l'étude de la morphologie de formes parasitaires, il colore les noyaux du kyste de *Giardia* au jaune ou au bruns les rendant plus visible à l'observation au microscope (Behr *et al.*, 1997 ; Shimizu, 2007 ; Geurden et Olson, 2011 ; Smith et Mank, 2011).

Il est nécessaire surtout pour déterminer les mouvements parasitaires (Trophozoite de *Giardia*) et les parasites qui flottent mal ou se déforment rapidement par les solutions de flottation (Shimizu, 2007 ; Zajac et Conboy, 2012 ; Koehler *et al.*, 2014),

L'examen microscopique sans enrichissement est peu coûteux, facile à mettre en œuvre en pratique mais de sensibilité faible, ce qui le rend déconseillé comme épreuve d'examen de routine (Flanagan, 1992 ; Zajac et Conboy, 2012). Toutefois il peut être largement suffisant lorsque les parasites sont présents en grand nombre dans l'échantillon (Smith et Mank, 2011)

V.1.1.2. Examen direct avec enrichissement

Pour augmenter la sensibilité de l'examen direct il est nécessaire de le précéder d'une étape de concentration pour les éléments parasitaires.

La technique de flottation au sulfate de zinc à 33 % associée souvent à une centrifugation est la méthode de choix pour l'identification des espèces de *Giardia* notamment en médecine vétérinaire (Thompson *et al.*, 1993 ; Conboy, 1997 ; Zajac *et al.*, 2002 ; Suliaman et Cama, 2006, Chalmers, 2009 ; Zajac et Conboy, 2012; Ridley, 2012 ; Koehler *et al.*, 2014 ; Caccio et Lalle, 2015).

La flottation au Sulfate de Zinc permet de faire remonter les éléments parasitaires (kystes de *Giardia*) à la surface d'une solution d'une densité de 1.18, supérieure à celle des parasites, qui peut être suivie ou non par une centrifugation pour accélérer le processus. Cette méthode a l'avantage de débarrasser l'échantillon de ses débris et elle est d'une mise en œuvre facile (Shimizu, 2007 ; Ridley, 2012 ; Zajac et Conboy, 2012).

D'autres solutions de flottation qui présente l'inconvénient d'être fortement agressives pour les kystes de *Giardia* sont aussi utilisables par certains, telles sont les solutions des sels saturés, Chlorure de sodium, Chlorure de césium, Sulfate de magnésium (Xiao et Cama, 2006 ; Radostits *et al.*, 2006 ; Geurden *et al.*, 2010 ; Zajac et Conboy, 2012), les limites d'utilisation de ces solutions dans les techniques de flottation sont détaillées dans l'annexe 1.

De toute façon les solutions de flottation qui excède généralement la densité de 1.25, exerce une forte pression osmotique sur les éléments parasitaires en les déformant, donc procéder à l'examen microscopique d'une manière précoce est le seul moyen pour remédier à ce défaut (Radostits *et al.*, 2006 ; Zajac et Conboy, 2012).

Contrairement aux solutions salées, la solution de flottation au sucre aide au repérage des cryptosporidies à l'état frais, car elle est moins déformante, elle est l'idéal pour le diagnostic de la cryptosporidiose par flottation particulièrement en médecine vétérinaire (Xiao et Cama, 2006; Smith, 2007 ; Zajac et Conboy, 2012 ; Vohra *et al.*, 2013 ; Gotfred-Rasmussen *et al.*, 2016). Les cryptosporidies y apparaissent d'une couleur rose à bleue grise au bout de 15 minutes à une heure environ, mais cette technique est moins fréquemment utilisée dans leur diagnostic car les oocystes perdent leur forme s'ils

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

dépassent le temps requis pour l'examen. De plus, la lecture des lames demande un personnel bien expérimenté (Vohra *et al.*, 2013 ; Caccio et Lalle, 2015).

Une autre méthode d'enrichissement est également d'usage courant, c'est la méthode de concentration par sédimentation, elle existe sous différentes variantes mais les méthodes diphasiques essentiellement celle de Ritchie modifiée (Méthode de concentration Formol-éther modifiée) semble l'idéal qu'elle soit en médecine vétérinaire ou humaine (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Smith, 2007 ; Gotfred-Rasmussen *et al.*, 2016).

Contrairement aux méthodes de flottation, dans la méthode de Ritchie modifiée, les éléments parasitaires détectés restent intacts, tout au long de la période de l'examen microscopique, en plus, leur suspension est exempte de matière grasse qui entrave la détection des parasites (Smith, 2007 ; Shimizu, 2007) puisque cette technique mis en jeu deux phases non miscibles, aqueuse et lipophile, dont l'effet combiné permet à la fois l'élimination des éléments lipophiles et la sédimentation des éléments parasitaires, mais il y a toujours plus de débris dans les préparations issus de la concentration par sédimentation que ceux issus de la concentration par flottation (Shimizu, 2007 ; Ridley, 2012). En outre, cette méthode est d'une longue période de montage car elle demande de nombreuses manipulations (Calero-Bernal et Carmena, 2018).

La concentration selon la méthode de Ritchie modifiée reste toutefois indispensable avant la coloration des cryptosporidies au Zheil-Neelsen car elle augmente significativement sa sensibilité (Casemore *et al.*, 1985 ; Shimizu, 2007).

V.1.2. Examen microscopique après coloration

Si cet examen est supplémentaire dans le diagnostic des espèces de *Giardia*, il est élémentaire pour celui des cryptosporidies du fait que les méthodes coproscopiques conventionnelles sont d'une faible sensibilité dans ce cas-là. De plus, l'observation directe des cryptosporidies requiert un œil exercé et bien averti.

Les experts de l'OMS recommandent l'utilisation des méthodes tinctoriales, notamment ceux de la coloration permanente, dans le diagnostic des protozoaires intestinaux (Ash *et al.*, 2004). Mais cela reste relativement utile en médecine vétérinaires (Zajac et Conboy, 2012).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

V.1.2.1. Coloration au MIF (Merthiolate Iode Formol)

Ce colorant est formé d'un mélange de Lugol, de teinture de merthiolate et de formol qu'on rajoute aux fèces pour visualiser les structures permettant l'identification des parasites: Le cytoplasme est coloré en rouge et les structures nucléaires en rouge sombre ou noir (Guillaum, 2007). Le résultat et la façon de réalisation de cette coloration sont identiques à l'examen au lugol sauf que les réactifs MIF sont d'une préparation plus compliquée (Michael *et al.*, 2010).

En principe elle est utilisée pour la mise en évidence des formes végétatives mais elle peut colorer également les formes kystiques de *Giardia* (Guillaum, 2007).

La coloration des fèces par MIF est une coloration qui s'effectue également en tube. Là-dedans les parasites y gravitent lentement, donnant un sédiment où se conserve les parasites de *Cryptosporidium* et *Giardia*, elle permet donc la concentration de ces deux espèces (Guillaum, 2007 ; Mehlhorn, 2016). Toutefois la concentration au MIF est d'une faible qualité en comparaison avec les autres méthodes destinée à cet effet pour ces deux parasites (Kovac *et al.*, 2003 ; Badparva *et al.*, 2009).

La coloration au MIF en tube colore et fixe les formes végétatives et kystiques des protozoaires (Guillaum, 2007). A partir du concentrée issus de cette technique on peut même réaliser les différentes colorations de diagnostic parasitologique (Bawden, 1993 ; Razakandrainibe *et al.*, 2014).

V.1.2.2. Coloration au Giemsa

La coloration de Giemsa est d'une procédure simple que l'on réalise sur des frottis de fèces à l'aide du colorant Giemsa. Cette coloration permet de colorer les oocystes de cryptosporidies dans les fèces chez l'homme et l'animal. Ils apparaissent semi translucides avec un cytoplasme bleu à bleu ciel parsemés de corpuscules rouge foncé et entourés d'un halo clair (Casemore *et al.*, 1985 ; Smith, 2007 ; Walochnik et Aspöck, 2012).

Étant donné le risque important de confusion des oocystes cryptosporidiens avec les levures et le temps requis pour la lecture (Khelef *et al.*, 2002 ; Vohra *et al.*, 2012), la coloration au Giemsa est délaissée par les parasitologues pour le diagnostic des cryptosporidies, elle convient seulement à la confirmation de sa morphologie en cas de suspicion (Casemore *et al.*, 1985). Elle ne donne pas un résultat satisfaisant comme épreuve de première intention (Khelef *et al.*, 2002).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Il n'y a pas que les cryptosporidies qui s'y colorent, la coloration au Geimsa convient également à la coloration des trophozoïtes et des kystes de *Giardia* (Smith et Mank, 2011 ; Koehler *et al.*, 2014).

V.1.2.3. Coloration à l'hématoxyline ferrique

La coloration à l'hématoxyline ferrique est une coloration permanente conçue à la fois pour l'identification et la quantification des parasites, c'est grâce à cette coloration que la morphologie de la plupart des protozoaires parasites de l'homme ont été décrit (Shimizu, 2007). Mais actuellement elle est d'une utilisation de moins en moins courante dans le diagnostic copro-parasitologique (Guillaum, 2007).

La coloration à l'hématoxyline ferriques nécessite une fixation préalable par la solution de Schaudinn (Shimizu, 2007; Walochnik et Aspöck, 2012) des selles fraîchement émises, condition indispensable pour sa réussite. Elle peut toutefois être menée avec des selles conservées dans du PVA ou SAF (Ash *et al.*, 2004).

La procédure pour cette coloration est d'une exécution longue et délicate qui se réalise selon trois principales phases, mordantage, coloration et différenciation par acide et/ou alcool mais avec de nombreuses manipulations d'une série des produits chimiques. A la fin une étape de déshydratation par de l'alcool pure et le xylène est utile pour le montage de la préparation (Shimizu, 2007 ; Ash *et al.*, 2004 ; Walochnik et Aspöck, 2012).

La coloration à l'hématoxyline ferrique a l'avantage de colorer les deux formes parasitaires, trophozoïte et kyste, qui apparaissent à l'issue de cette coloration d'une couleur bleu gris à l'intérieur desquels les structures nucléaires prennent une coloration plus intense (Guillaum, 2007 ; Shimizu, 2007). Elle est bonne pour la coloration des trophozoïtes de *Giardia* (Walochnik et Aspöck, 2012).

Quant aux inconvénients, les protozoaires parasites se quantifient mal par cette méthode, à l'exception de *Blastocystis* qui en donne une évaluation approximative. De plus la coloration à l'hématoxyline ferrique ne permet pas l'identification des cryptosporidies, mais lorsque l'on associe à l'éosine (hématoxyline-éosine) elle permet la coloration les différents stages du parasite sur les coupes histologiques (Shimizu, 2007 ; Vohra *et al.*, 2012).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Une autre combinaison de l'hématoxyline ferrique au carbol fushine de Kinyoun donne de bons résultats à l'identification des acido-alcool-résistants tel est le cas de *C. parvum* (Shimizu, 2007).

V.1.2.4. Coloration au trichrome de Gomori-Wheatley

C'est une coloration qui s'effectue à l'aide d'une solution à chromotrope. La coloration au trichrome se réalise sur un frottis ayant subi les deux phases de coloration à la Fushine et la décoloration par un mélange acide- alcool. Au terme de cette coloration, les éléments parasitaires prennent une couleur rose pétant ou violet (Shimizu, 2007 ; Ridley, 2012), c'est la technique de deuxième choix dans le diagnostic de la giardiase en microscopie direct, elle permet d'identifier à la fois les formes kystiques et végétatives (Thompson et Reynoldson, 1993 ; Geurden et Olson, 2011 ; Ridley, 2012), mais elle est pratiquée davantage en médecine humaine (Zajac et Conboy, 2012). Par contre elle est peu fiable dans le diagnostic de la cryptosporidiose car les coccidies se colorent mal avec le trichrome, pour ce parasite le trichrome donne de meilleurs résultats lorsqu'il est réalisé sur des matières fécales fraîches (Ash *et al.*, 2004 ; Shimizu, 2007).

V.1.2.5. Coloration négative de Heine

Elle fait partie des méthodes les plus sensibles dans la détection des oocystes de *Cryptosporidium*, elle convient dans l'orientation du diagnostic de la cryptosporidiose (Khelef *et al.*, 2002 ; Vohra *et al.*, 2012) mais la nécessité d'un microscope à contraste de phase pour l'observation microscopique limite son utilisation (Caccio et Lalle, 2015).

Dans cette technique on utilise de la fushine qu'on incorpore dans une quantité égale de matière fécale sur une lame, on en réalisant un frottis, les cryptosporidies y apparaissent incolores mais réfringents sur un fond rouge au bout de seulement 15 minutes suivant leur coloration. La structure interne des oocystes peuvent être visualisée sous forme de taches noires à l'intérieure (Chartier *et al.*, 2002 ; Kuhnert-Paul *et al.*, 2012 ; Vohra *et al.*, 2012).

Il existe également d'autres colorants agissant selon le même principe, comme le vert de malachite, la nigrosine et autres, mais de tous ces colorants, le vert de malachite a donné le meilleur résultat (Thompson *et al.*, 2008 ; Vohra *et al.*, 2012).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

V.1.2.6. Coloration à l'Auramine-Phénol (AP)

La coloration à l'Auramine O est une épreuve d'orientation d'une grande efficacité, elle utilise différents dérivés, auramine-rhodamine, auramine-carbolfuch sine ou encore l'acridine orange (Vohra *et al.*, 2012)

La coloration à l'auramine-phénol s'effectue en trois étapes, au première les parasites retiennent le colorant primaire qui est l'auramine-phénol puis durant la décoloration (acides forts, alcools) seulement qui sont acido-alcool- résistants emprisonnent le colorant grâce à leur paroi cellulaire et conservent la couleur jaune vif de l'auramine. La troisième étape est faite pour étancher la fluorescence en arrière-plan en utilisant le permanganate de potassium (Smith, 2007).

La coloration par cette technique a été largement pratiquée dans l'identification des espèces de *Cryptosporidium* qui émettent une fluorescence lumineuse caractéristique ce qui améliore leur observation (Olson, 2002 ; Quadros *et al.* 2006 ; Smith, 2007 ; Chalmers, 2009), mais son seuil de détection assez élevé réduit son utilisation dans le diagnostic de ce parasite (Smith, 2007 ; OIE, 2008 ; Vohra *et al.*, 2012).

La coloration à l'Auramine-Phenol est plus performante que la coloration de Zeihl Neelsen modifiée dans le diagnostic de la cryptosporidiose car l'Auramine-Phenol présente une affinité supérieure envers les oocystes cryptosporidiens, en plus, cette technique est d'une mise en œuvre et de lecture rapide (Casemore *et al.*, 1985 ; Smith, 2007 ; Vohra *et al.*, 2012).

Mais lorsque la microscopie à fluorescence n'est plus disponible, le diagnostic de la cryptosporidiose s'effectue nécessairement par la coloration de Zeihl-Neelsen.

Il est également envisageable de la confirmer par d'autres techniques de coloration moins performantes, la coloration au Geimsa (Casemore *et al.*, 1985 ; Smith, 2007) ou celle de Heine (Khelef *et al.*, 2007 ; Vohra *et al.*, 2012).

V.1.2.7. Coloration de Zeihl-Neelsen modifiée (mZN)

Cette technique s'avère des méthodes les plus performantes dans l'identification des cryptosporidies (Khelef *et al.*, 2002). C'est celle que l'on recommande pour l'identification des oocystes de *Cryptosporidium* (Ash *et al.*, 2004 ; Smith, 2007) notamment dans les pays en voie de développement, en raison de son faible coût, la

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

facilité de sa mise en œuvre , et l'utilisation d'un microscope optique simple (Xiao et Carma, 2006).

Cette technique existe sous différentes variantes. Elle fut développée par Henriksen et Pohlenz (Ziehl–Neelsen modifiée) en 1981 qu'ils l'ont dérivé de la méthode de Zeihl-Neelsen conçue pour la coloration des bactéries acido-alcool résistantes. Garcia *et al.* en 1983 et Casemore *et al.* en 1984 l'avaient encore modifié pour qu'elle devienne la méthode de choix dans l'identification des oocystes cryptosporidiens. Ils utilisaient la fushine basique comme colorant primaire, l'Acide hydrochloridrique/alcool comme décolorant et le vert de malachite qui est un colorant de contraste permettant la recoloration des éléments qui n'ont pas retenus la colorant primaire (Casemore *et al.*, 1985 ; Smith, 2007).

À l'origine cette coloration s'effectue à chaud mais une autre modification qui y est apportée, a permis de la réaliser à froid également (Vohra *et al.*, 2013), on remplaçait l'effet de la chaleur au mordantage par une fushine plus phéniquée encore appelée Carbol fushine. De nombreuses autres modifications ont été apportées à cette technique pour réduire au temps ou/et réactifs de cette coloration (Lennette *et al.*, 1985 ; Martinez et Belda Neto, 2001 ; Smith, 2007).

Lorsque le nombre d'oocystes est réduit dans les matières fécales, surtout dans les fèces formolées à dure, la Ritchie modifiée, formol-ether concentration est nécessaire pour concentrer les oocystes au préalable (Casemore *et al.*, 1985 ; Xiao et Cama, 2006 ; Smith, 2007 ; Shimizu, 2007). Certains laboratoires ne concentre pas les selles et réalisent la coloration sur un simple frottis de matières fécales, cela expose au risque d'une lecture plus difficile (Guyot *et al.*, 2012)

Depuis la première coloration des cryptosporidies au Geimsa par Tyzzer, aucune autre méthode n'a donnée de résultats aussi satisfaisant tant au spécificité qu'au sensibilité que la méthode de Ziehl-Neelsen modifiée, Cependant elle reste une technique chronophage et onéreuse, elle demande plusieurs manipulations et requiert une grande expérience dans l'interprétation des résultats (Fayer *et al.*, 2000).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

V.2. Méthodes immunologiques

Ces méthodes détectent le plus souvent les anticorps produits lors de la réponse immunitaire de l'organisme hôte envers les parasites, ou encore les antigènes parasitaires dans certaines épreuves.

Le diagnostic sérologique de ces deux parasites dans les fèces est peu fiable, faute de sensibilité et de spécificité que ces méthodes ont éprouvé (Flanagan, 1992 ; Razakandrainibe *et al.*, 2014 ; Thompson et Reynoldson, 1993 ; Behr *et al.*, 1997). Par contre la détection des antigènes parasitaires dans la matière fécale par l'approche immunologique à toute son importance dans leur diagnostic, car elle est d'une haute sensibilité et de bonne spécificité (Chartier *et al.*, 2002 ; Razakandrainibe *et al.*, 2014). Les inconvénients sont là encore la durée et la lourdeur de la réalisation de ces deux techniques (Chartier *et al.*, 2002 ; Elsafi *et al.*, 2013) ainsi que le nombre importants de faux positifs à cause des réactions croisées avec d'autres pathogènes (Ridley, 2012 ; Kuhnert-Paul *et al.*, 2012 ; Vohra *et al.*, 2013).

Le diagnostic immunologique des deux parasites, *Cryptosporidium* et *Giardia*, est réalisé souvent par le test d'ELISA et l'immunofluorescence directe (Sulaiman et Cama, 2006; Razakandrainibe *et al.*, 2014) ou encore moins à l'aide des techniques de séparation immunochromatographiques, notamment dans les pays développés (Xiao et Cama, 2006). Des kits sont actuellement disponibles pouvant détecter de nombreux parasites à la fois (Xiao et Cama, 2006 ; Chalmers, 2009).

D'autres méthodes ont été également élaborées pour l'identification de ces parasites à l'exemple de test d'agglutination au latex à bas d'anticorps monoclonaux pour la détection de *Cryptosporidium* dans les fèces (Chartier *et al.*, 2002), et les kits d'immuno-fluorescence utilisant FITC-G-Mabs (Fluorescein Isothiocyanate conjugated antibodies), anticorps conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine, conçues pour la détection des kystes de *Giardia* dans les fèces (Smith et Paget, 2007).

V.2.1. Le test d'ELISA

Ce test est basé sur la mise en évidence des antigènes parasitaires dans les fèces, par le biais des anticorps monoclonaux fixés sur une phase solide. La présence du complexe antigène-anticorps formé se révèle par la suite à l'aide d'une réaction colorimétrique (Chartier *et al.*, 2002 ; Caccio et Lalle, 2015).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Le diagnostic par l'ELISA des deux parasitoses, giardiase et cryptosporidiose est du surcroît (Chalmers, 2009), c'est un test d'une mise en œuvre simple, très sensible et d'une spécificité comparable à celle des techniques coproscopiques, il convient pour l'analyse de gros lots d'échantillons ou également le suivi de l'efficacité de l'approche thérapeutique (Behr *et al.*, 1997 ; Suliaman et Cama, 2006 ; Chalmers, 2009 ; Caccio et Lalle, 2015).

V.2.2. Immunofluorescence direct (DFA)

Cette technique est une méthode de diagnostic qui révèle une réaction Ag-Ac grâce à un fluorogène, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), qui est conjugué à des anticorps monoclonaux (mAbs) reconnaissent spécifiquement les antigènes à la surface des formes parasitaires quiescentes (Caccio et Lalle, 2015 ; Smith et Paget, 2007) présents sur des étalements fécaux séchés à l'air libre et fixés dans de l'alcool. Une excitation UV utilisant un système de filtre FITC (longueur d'onde d'excitation de 490 nm, émission moyenne 530 nm) induit une fluorescence vert pomme brillante permettant ainsi de repérer les parasites sous un microscope à fluorescence à l'objectif $\times 20$ puis l'objectif $\times 40$, les oocystes reconnus à l'objectif $\times 40$ peuvent également être quantifiés par cet technique (OIE, 2008).

L'utilisation de l'immunofluorescence directe accroît significativement la spécificité du diagnostic pour *Cryptosporidium* et peut être considéré comme épreuve d'examen primaire ou de confirmation (Shimizu, 2007). Cette technique est également sensible dans la détection des kystes de *Giardia* (Smith et Paget, 2007).

Bien qu'elle soit avantageuse dans le diagnostic de *Giardia* et *Cryptosporidium*, l'immunofluorescence direct sur-estime généralement la charge parasitaire à cause des réactions croisées avec d'autres espèces de *Cryptosporidium* qui ne sont pas infectieuses pour l'homme, des petites algues unicellulaires et d'oocystes non viables (Bednarska *et al.*, 2007).

V.2.3. Analyse immunochromatographique (ICT)

Est une technique d'analyse rapide (15 min) facile à réaliser et à interpréter, elle est d'usage pratique dans le diagnostic clinique de la giardiase et la cryptosporidiose pour l'examen d'échantillon individuel dans les laboratoire à faible revenu (Chalmers, 2009 ; Elsafi *et al.*, 2013 ; Caccio et Lalle, 2015 ; Van den Bossche *et al.*, 2015). Les premières

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

évaluations indiquent une sensibilité et une spécificité comparables aux techniques immuno-enzymatiques pour le diagnostic des parasites de *cryptosporidium* et de *Giardia* chez les humains (Xiao et Cama, 2006 ; Esafi *et al.*, 2013).

Les tests immunochromatographiques sont disponibles sous forme de plaquette ou de tigelette qui permettent la détection d'antigènes d'un ou de plusieurs parasites protozoaires (Van den Bossche *et al.*, 2015). La réaction est de même principe que la technique ELISA, elle se déroule sur du matériel réactif où les antigènes parasites solubles peuvent se lier à des anticorps immobilisés et génèrent un résultat qualitatif considéré comme une zone colorée à un emplacement spécifique marqué sur la bandelette de la tigelette ou les puits de la plaquette (Chalmers, 2009 ; Caccio et Lalle, 2015).

Les analyses immunochromato-graphiques qualitatives en phase solide détectant *G. lamblia* et *C. parvum* dans les selles humaines sont devenues des outils de diagnostic populaires car elles suppriment le besoin d'expérience, d'équipement coûteux et la longue période de traitement nécessaire pour effectuer des tests DFA ou des EIA (Garcia et Shimizu 2000 ; Oster *et al.*, 2006). Les évaluations initiales indiquent une sensibilité et une spécificité comparables à celles des tests précédemment disponibles (Elsafi *et al.*, 2013)

V.3. Méthodes moléculaires

Les méthodes de diagnostic moléculaire procurent une meilleure sensibilité et d'excellente spécificité par rapport à la fois aux méthodes coproscopiques et immunologiques (Chalmers et Casemore, 2004 ; Bednarska *et al.*, 2007 ; Smith, 2007 ; Caccio et Lalle, 2015 ; Calero-Bernal et Carmena, 2018).

Ces méthodes constitue une bonne approche de diagnostic pour les parasites (Sulaiman et Cama, 2006), c'est le seul outil de caractérisation et d'identification de leurs génotypes et/ou sous-type (Koehler *et al.*, 2014 ; Vohra *et al.*, 2013). Mais leur utilisation actuelle en tant qu'outil de diagnostic reste controversée car les difficultés d'extraction de l'ADN en présence des inhibiteurs ainsi que de l'ADN libre et plus généralement l'absence d'un protocole standard constitue des contraintes majeurs limitant leur usage dans les analyses routinières de détection de ces parasites (Caccio et Lalle, 2015 ; Kuhnert-Paul *et al.*, 2012 ; Vohra *et al.*, 2013). En outre, ces méthodes requièrent un matériel coûteux qui est le plus souvent hors de la portée des laboratoires de médecine vétérinaire (Guerden *et al.*, 2010 ; Vohra *et al.*, 2013).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

L'analyse par l'approche moléculaire regroupe de nombreuses méthodes, mais les techniques de la PCR en constitue l'idéal car qu'outre qu'elles soit sensibles, elles sont spécifiques et capable de détecter même les parasites non viables (Bednarska *et al.*, 2007).

V.3.1. Techniques de PCR

La technique de PCR (Polymerase chain reaction) fait amplifier sélectivement des fragments du matériel génétique parasitaire in vitro pour en obtenir un nombre considérable de copies d'une séquence d'ADN dite cible (weiss *et al.*, 1992 ; Ryan *et al.*, 2015).

L'amplification de ce matériel génétique est suivi souvent d'un séquençage et/ou également d'une digestion à l'aide d'outils appropriés qui sont les enzymes de restriction (Koehler *et al.*, 2014), l'amplification de l'ADN par PCR associée à la digestion par les enzymes de restriction est dite PCR-RFLP (Bertrand, 2005).

La PCR-RFLP est couramment utilisée pour le génotypage des deux parasites *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les études épidémiologiques (Xiao *et al.*, 2001 ; Chalmers et Casemore, 2004 ; Smith, 2007; Koehler *et al.*, 2014 ; Caccio et Lalle, 2015). Dans certains cas la PCR-RFLP est incapable de détecter toutes les séquences et les tailles de variation au cours de l'amplification donc le séquençage demeure l'idéal outil pour déterminer la variation génétique dans ces cas-là.

En outre, le séquençage d'ADN après PCR aide dans la comparaison des séquences génétiques ainsi qu'à l'étude de la phylogénie (Koehler *et al.*, 2014 ; Nichols *et al.*, 2014, Ryan *et al.*, 2015).

L'identification des parasites selon les techniques de PCR conventionnelles étaient les premières utilisées dans l'identification et le génotypage des deux parasites, *Giardia* et *Cryptosporidium* (Bertrand, 2005 ; Xiao et Ryan, 2007), toutefois ce sont des techniques qui demandent de grandes quantités d'ADN et s'effectueront sur de longues durées de temps (Bertrand, 2005 ; Nichols *et al.*, 2014).

Les techniques de PCR conventionnelles soit sous la forme d'une procédure simple ou nichée (Nested-PCR) suivie d'un séquençage de produits d'amplification sont largement utilisées actuellement à des fins de recherche principalement lors des enquêtes épidémiologiques (Caccio et Lalle, 2015 ; Smith, 2007).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

V.3.1.1. PCR simple

Utilise une paire d'amorce d'oligonucléotides pour amplifier une petite partie de l'ADN parasitaire (Bertrand, 2005 ; Ryan *et al.*, 2015). La spécificité de ce test est liée d'une part à la cible et le motif des amorces et d'autre part au test d'optimisation. Mais la sensibilité est typiquement élevée (OIE, 2008).

Etant donné la complexité et le coût, ces méthodes de détection ne sont généralement pas considérées aujourd'hui comme des procédures adaptées à une utilisation courante au laboratoire de diagnostic (OIE, 2008).

V.3.1.2. PCR nichée

Les épreuves de PCR nichée utilisent deux jeux de cycles d'amplification avec 4 amorces, désignées amorces externe et interne. En général, les épreuves de PCR nichée présentent une sensibilité et une spécificité analytiques supérieures par rapport aux épreuves de PCR simple. Cependant, il existe un risque important de contamination croisée car les produits issus du premier cycle d'amplification sont souvent utilisés comme matrice de départ pour le deuxième cycle, ce qui peut entraîner des transferts de matériel entre les différents tubes de PCR (Bertrand, 2005).

La PCR nichée présente une sensibilité élevée (Smith, 2007). Sa spécificité analytique est également augmentée car dans la PCR nichée, 4 amorces d'oligonucléotides doivent se lier spécifiquement avec les cibles sélectionnées afin de donner une réaction positive. La PCR nichée est capable de détecter la plupart des espèces cryptosporidiennes et de *Giardia* ainsi que leurs génotypes, c'est une épreuve fortement recommandée dans de nombreux laboratoires dans le monde (Bertrand, 2005 ; Smith, 2007).

V.3.1.3. PCR en temps réel (qPCR)

Par cette technique, l'ADN parasitaire est détecté précocement pendant les cycles initiaux de la réaction grâce à des colorants fluorogènes qui sont incorporés dans l'amplicon pendant la PCR, ainsi, la fluorescence d'amplicon augmente à mesure que le produit de PCR est généré (Guy *et al.*, 2003 ; Smith, 2007 ; Ryan *et al.*, 2015), la quantité des amplicons est corrélée à la quantité initiale d'ADN de la matrice originale, ce qui permet de quantifier également la matrice parasitaire originale (Guy *et al.*, 2003 ; Smith, 2007 ; Nichols *et al.*, 2014 ; Bertrand, 2005).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

C'est une technique sensible (Guy *et al.*, 2003 ; Smith, 2007 ; Feng et Xiao, 2011), automatisée et rapide dont l'utilisation peut réduire le risque de contamination croisée (Vohra *et al.*, 2013 Ryan *et al.*, 2015). Étant donné son utilisation pour la détection simultanée de pathogènes multiples, elle peut représenter une alternative diagnostique possible dans le laboratoire clinique (Vohra *et al.*, 2013 ; Nichols *et al.*, 2014 ; Caccio et Lalle, 2015). Elle est également idéal pour le diagnostic de certains protozoaires parasites dans l'environnement, elle permet de quantifier les oocystes de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans différentes substrats, eau de surface, eau usée, boue et aliments (Guy *et al.*, 2003 ; Bertarnd, 2005 ; Smith, 2007 ; Nichols *et al.*, 2014 ; Ryan *et al.*, 2015).

V.3.1.4. PCR multiplexe

Dans cette techniques différentes cibles peuvent être amplifiées simultanément d'où l'appellation « multiplexe ». En PCR multiplexe, des agents infectieux variés peuvent être détectés et différenciés dans un même tube et en même temps (Bertrand, 2005 ; Ryan *et al.*, 2015), dans les plus récentes études, les nouveaux schémas du PCR multiplexe se sont avérés plus fructueux dans l'identification de *Cryptosporidium* spp. et de différents assemblages de *Giardia* (Vohra *et al.*, 2012 ; Caccio et Lalle, 2015).

L'identification des différents segments des cibles amplifiés dans les épreuves classiques de PCR s'obtient en déterminant la taille des produits de PCR, lorsqu'on les utilise pour la construction des épreuves multiplexes par PCR nichée, la procédure devient plus compliqué car elle demande que les cibles soient de différentes tailles, et encore plus les amorces peuvent entrer en compétition dans le mélange réactionnel, ces deux facteurs peuvent avoir un impact négatif sur l'efficacité de la PCR. En revanche, le concept de PCR en temps réel (paires d'amorce unique, taille uniforme des cibles) donne d'excellentes possibilités pour la construction des systèmes multiplexes (OIE, 2008), elle est d'une haute sensibilité, elle permet d'identifier des groupes de pathogènes variés et différencie les membres dans chacun (Smith, 2007).

V.3.2. Marqueurs (cibles) utilisés en PCR

Les premiers protocoles de la PCR utilisaient des fragments conservés des gènes structurels, d'entretien ou antigéniques pour la détection et la différenciation des espèces des deux genres, *Giardia* et *Cryptosporidium* (Xiao, 2009 ; Caccio et Lalle, 2015).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Ces protocoles ont permis l'identification précise des espèces et/ou assemblages de *Giardia* et quelques espèces de *Cryptosporidium* (*C. hominis*, *C. parvum* et *C. meleagridis*) dans différents substrats (matière fécale animale et humaine, eau) toutefois il se sont montrés insuffisants pour la détermination des variations génétiques au sein de l'assemblage/espèce de *Giardia* et même incapables d'amplifier certaines espèces les plus éloignées de *Cryptosporidium* tels sont de *C. canis*, *C. felis*, *C. muris* et *C. andersoni* (Sulaiman et Cama, 2006 ; Smith, 2007 ; Xiao, 2009 ; Feng et Xiao, 2011 ; Nichols *et al.*, 2014 ; Caccio et Lalle, 2015 ; Thompson et Ash, 2016).

Le gène 18S ARNr a permis la caractérisation de la plupart des espèces de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*) (Smith, 2007) et de *Giardia* (Koehler *et al.*, 2014) qui s'est généralisé par la suite sur tous les protocoles de PCR conduite à la recherche de ces deux parasites .

Parfois on a recours à des gènes supplémentaires qui sont généralement HSP70, COWP pour la caractérisation des espèces de *Cryptosporidium* (Thompson et Ash, 2016).

Des marqueurs d'une haute variabilité génétique se font impliqués actuellement dans les protocoles de PCR qui se sont montrés efficace pour l'identification des sous-types. À cet effet différents gènes ont été choisis pour les espèces de *Cryptosporidium* tels sont les gènes *gp60* et ITS-1-2 (Ramo *et al.*, 2015 ; Thompson et Ash, 2016) mais le plus utilisée dans le sous-typage est celui du gène *gp60*, elle a permis de discriminer entre les nombreux sous-types dans les deux espèces *C. parvum* et *C. hominis* (Xiao, 2009 ; Thompson et Ash, 2016) .

Pour les espèces de *Giardia* le sous-typage est réalisé souvent par le gène *tpi* qui s'est avéré présenter le degré le plus élevé de polymorphisme chez *G. intestinalis* à la fois au niveau inter- et intra-génotypique (Sulaiman et Cama, 2006 ; Xiao et Feng, 2009). Pour cette même espèce, la région ITS1-5.8s-ITS2, qui a récemment montré des succès remarquable à l'amplification, présente aussi une bonne variation génétique, mais le potentiel de cette région pour le sous-typage n'est toujours pas assez clair, en particulier pour *G. enterica*, si l'on compare aux résultats obtenus par les gènes de la *bg* de la *gdh* pour cette même espèce (Thompson et Ash, 2016).

Les anciens protocoles se sont appuyés sur des séquences génétiques d'un ou de deux loci dont les principales sont ceux du gène codant pour 18S ARNr (Smith, 2007 ;

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Geurden *et al.*, 2010; Feng et Xiao, 2011 ; Koehler *et al.*, 2014), mais cela a conduit à des problèmes lors de l'interprétation.

Actuellement de nouveaux protocoles ont été développés à partir des loci de gènes présentant une variabilité très élevée qui ont été utilisés ensemble et avec différentes combinaisons pour le génotypage selon ce qu'on appelle MLST (Multilocus sequence typing), et cela dans une même épreuve par PCR multiplexe.

Les nouveaux schémas MLST sont principalement basés sur des gènes d'entretien, et la variation génétique que présente ces marqueurs semble suffisante voire idéale à la fois pour le génotypage et le sous-typage (Caccio et Lalle, 2015 ; Ryan *et al.*, 2015) .

L'analyse MLST est de plus en plus utilisée pour la caractérisation et l'identification de *G.duodenalis* pareillement chez les humains et les animaux (Feng et Xiao, 2011 ; Koehler *et al.*, 2014 ; Thompson et Ash, 2016), elle est efficace lorsqu'on associe les trois marqueurs, *gdh*, *bg* et *tpi* (Feng et Xiao, 2011).

Pour les cryptosporidies Il n'y a pas de schéma standard MLST, et une variété de loci ont été utilisés dans de nombreuses enquêtes épidémiologiques entreprises à travers le monde (Nichols *et al.*, 2014).

La haute variabilité des loci à répétition en tandem, également connu sous le nom minisatellites et microsatellites constitue actuellement des marqueurs génétiques de choix pour l'identification et la compréhension des voies de transmission ainsi qu'à la dynamique de *Cryptosporidium* par l'approche MLST (Smith, 2007 ; Hunter, 2009 ; Xiao, 2009 ; Ryan *et al.*, 2015), elle donne de bon résultats dans le sous-typage (Smith, 2007 ; Xiao, 2009).

La technique de microsatellites reste limitée aux cryptosporidies car ces marqueurs chez les espèces de *Giardia* n'ont pas été identifiés jusqu'à présent (Caccio et Sprong, 2011 ; Caccio et Lalle, 2015).

Le tableau 3 présente les gènes couramment utilisés dans la caractérisation moléculaire des espèces de *Giardia* et *Cryptosporidium*.

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Tableau 3: Les marqueurs Couramment utilisés pour la caractérisation moléculaires des espèces de *Giardia* et de *Cryptosporidium* (Thompson et Ash, 2016)

Gène/loci	Nombre de copie de gène	Fiabilité de différenciation des espèces et/ou sous-génotypes	Fréquence et avantages d'utilisation dans l'analyse
<i>Giardia</i> spp.	Multiple	Information sur l'espèce	Usage courant
SSU-ADNr			Fournit souvent une bonne amplification
ITS1-5.8S-ITS2	Multiple	Information sur l'espèce et sur certains sous-génotypes	Récemment introduite
<i>tpi</i>	Unique	Information sur l'espèce Information sur certains sous-génotypes Les amorces spécifiques des espèces sont désignées Information sur l'espèce	Couramment utilisée Bonne amplification Usage en suspicion d'infections mixtes
<i>bg</i>	Unique	Information sur certains sous-génotypes Information sur l'espèce	Couramment utilisée Succès d'amplification est variable Spécifique à <i>Giardia</i>
<i>gdh</i>	Unique	Information sur certains sous-génotypes Information sur l'espèce	Couramment utilisée-Succès d'amplification est variable Non couramment utilisée
<i>efl-α</i>	Unique	Information sur certains sous-génotypes	Succès d'amplification est variable
<i>Cryptosporidium</i> spp.		Information sur l'espèce	Couramment utilisé-Meilleur succès d'amplification
SSU-ADNr	Multiple	Information sur le génotype	Non couramment utilisé
ITS-1		Information sur l'espèce Information sur le génotype	Bon succès d'amplification
HSP70	Multiple	Information sur l'espèce et sur le génotype	Couramment utilisé

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

		Information sur l'espèce	Bon succès d'amplification
<i>gp60</i>	Unique	Information sur les sous-génotypes	Couramment utilisé
		Information sur l'espèce	Succès d'amplification variable
COWP	Unique	Information sur le génotype	Couramment utilisé
			Succès d'amplification variable

IV. Traitement et prophylaxie

IV.1. Traitement

Le traitement de la cryptosporidiose chez l'animal actuellement est un traitement de soutien, il repose sur la réhydratation et la reconstitution des électrolytes chez l'animal jusqu'à ce qu'il devient immuno-résistant, il est également nécessaire de procéder aussitôt à une antibiothérapie en cas de coïnfection avérée.

Il est toutefois utile d'envisager une chimiothérapie putative (De Graaf *et al.*, 1999 ; Radostits *et al.*, 2007 ; Thompson *et al.*, 2008 ; Stockdale *et al.*, 2008).

A cet effet, de nombreuses molécules ont été testées contre la Cryptosporidiose mais aucune n'a donné de résultat satisfaisant aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Cependant chez les ruminants domestiques, deux molécules semblent être effectives sur les modèles expérimentales, le lactate d'halofuginone et la paramomycine. Dans l'état naturel ces médicaments sont beaucoup plus symptomatiques que curatifs, leur efficacité semble être supérieure en préventif (Armson *et al.*, 2003 ; Radostits *et al.*, 2007 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Thompson *et al.*, 2008 ; Mead and Arrowood, 2014). Decoquinate et Lasalocide, sont deux molécules coccidiostatiques, parfois utilisées dans le traitement de la cryptosporidiose chez les ruminants (Thompson *et al.*, 2005 ; Stockdale *et al.*, 2008), mais ces molécules restent toujours administrer à titre prophylactique.

Devant l'échec de la chimiothérapie, la recherche s'oriente vers l'immunothérapie pour l'élaboration d'un vaccin permettant de produire un colostrum hyperimmun qui immunisera les jeunes et vise ainsi à réduire la charge parasitaire chez ceux-ci (Mead et Arrowood, 2014), mais cette alternative n'a permis guère de protéger ni les veaux, ni les agneaux de l'infestation cryptosporidienne, elle a abouti seulement à réduire le niveau d'excrétion des oocystes et améliorer l'état sanitaire de l'animal (Thompson *et al.*, 2005).

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

Si le traitement est plus au moins encourageant pour la cryptosporidiose animale, il l'est encore moins dans le cas de la giardiase. Aucun médicament n'est autorisé pour le traitement des ovins, des caprins et des porcins malgré les essais thérapeutiques par des molécules chimiques et d'autres naturels (curcuma et la menthe poivrée/Acides ginkgoliques) qui ont donné des résultats prometteurs chez les animaux *in vitro* (Geurden et Claerebout, 2010). Il semble que seuls les bovins ont montrés une sensibilité à l'Albendazole (anthelmintique) et la Paromomycine (Antibiotique), des molécules effectives pour le traitement des jeunes veaux (Xiao, 1994 ; Radostits *et al.*, 2006 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Geurden *et al.*, 2010).

Les médicaments Nitro-Imidazolés utilisés dans le traitement de la giardiase humaine (Shakespeare, 2009) ont éprouvé également une efficacité partielle chez les veaux en médecine vétérinaire mais ces molécules ont permis de réduire seulement les symptômes 'jusqu'à l'heure actuelle. Plusieurs composés se sont montrés contraignants à la croissance du parasite, sa capacité d'adhérence et sa morphologie *in vitro*, Cependant, aucun n'a été évalué jusqu'ici chez les animaux pendant une exposition continue à l'infection. L'approche alternative la plus prometteuse est probablement la vaccination (Guerden et Claerebout, 2010).

Dans les cas de prévalences élevées il est envisageable d'administrer le vaccin chez les animaux notamment ceux qui présentent un risque de transmission zoonotique. En Amérique du nord, des vaccins destinés aux chiens et aux chats sont actuellement commercialisés sous les noms GiardiaVax® et FeIO-Vax®. Le vaccin GiardiaVax® s'avère efficace surtout chez les jeunes animaux. Même si la protection n'est pas totale, la vaccination permet de réduire l'intensité des signes cliniques, la durée du portage et donc la quantité de kystes excrétés. La vaccination des animaux domestiques et d'élevage devrait également permettre de limiter la transmission intra et inter-espèces notamment avec les animaux sauvages (Bertrand, 2005).

IV.2. Prophylaxie

En absence des molécules curatives efficaces contre la cryptosporidiose ainsi que la giardiase, la prévention reste le meilleur moyen pour minimiser le risque de ces deux parasitoses en élevage animal. Il s'agit de réduire le nombre des oocystes et/ou kystes présents dans l'environnement et de maintenir la contamination parasitaire à son faible niveau.

I. L'état actuel des connaissances sur *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage et l'homme

A cet effet des mesures d'hygiène et d'autre liée à la gestion des élevages devront être respectées.

Il est impératif, tout d'abords, de séparer les animaux malades des animaux sains qu'ils doivent être mis en quarantaine dans des installations capable d'être nettoyés et désinfectés (Stockdale *et al.*, 2008).

Il est également nécessaire d'accorder une attention particulière à l'hygiène dans les locaux d'élevage (De Graaf *et al.*, 1999 ; Guerden et Claerebout, 2010) . Elle doit être maintenue à un niveau élevé notamment dans la période de maternité et dans les installations des jeunes. Les équipements principalement les systèmes d'alimentation et d'abreuvement doivent faire l'objet d'un nettoyage systématique (Taylor *et al.*, 2007 ; Stockdale *et al.*, 2008) et procéder à la désinfection des bâtiments d'élevage d'une manière constante en utilisant la chaleur humide ou des désinfectants chimiques suivi d'une longue période de séchage.

Les jeunes animaux, plus susceptible à la maladie doivent d'une part recevoir une quantité suffisante de colostrum dès les premiers jours de leur vie (Taylor *et al.*, 2007 ; Stockdale *et al.*, 2008), afin de réduire leur réceptivité aux parasites. D'autre part, les loger en fonction de leur âge séparément des adultes qui constitue des réservoirs latents (Radostits *et al.*, 2007 ; Taylor *et al.*, 2007).

Eviter aussi le surpeuplement dans les locaux d'élevage et réduire le contact entre animaux, car il a été constaté que les animaux élevés à l'intensif sont trois fois plus exposés au risque de contamination que ceux élevé en extensif où cette condition est maintenue (Guerden et Claerebout, 2010).Et tacher éventuellement à limiter l'accès des rongeurs, les mouches et des mammifères sauvages aux locaux d'élevage et aux zones d'entreposage des aliments de bétail (Radostits *et al.*, 2007 ; Stockdale *et al.*, 2008).

Traiter les maladies récurrentes capables d'exacerber la maladie chez l'animal et envisager un traitement prophylactique prolongé (Taylor *et al.*, 2007 ; Geurden et Claerebout, 2010) est une bonne manière pour renforcer la chimiothérapie et la rendre efficace.

Chapitre II.

Méthodologie

II. Méthodologie

Dans le cadre de cette thèse et afin d'étudier la prévalence des parasites *Giardia* et *Cryptosporidium* en relation des facteurs de risque chez les animaux d'élevage dans la steppe algérienne ainsi que le potentiel zoonotique qui leur sont associé, nous avons établi un protocole de travail dont la conception est réalisée selon les données bibliographiques, la disponibilité du matériel et l'accessibilité aux animaux d'élevage. Deux stratégies ont été envisagées pour résoudre à ces deux problématiques :

Dans un premier temps un échantillonnage aléatoire a été entrepris dans différents sites de la steppe centrale d'Algérie, Laghouat, Djelfa et El-Bayadh, pour la collecte des échantillons à partir des animaux sujets d'investigation ;

Et dans un deuxième temps, les analyses de laboratoire ont été pratiquées sur ces échantillons à l'aide des méthodes de diagnostic conventionnel afin de mettre en évidence nos deux parasites, *Giardia* et *Cryptosporidium*, et à l'aide des méthodes de diagnostic moléculaire pour déterminer l'identité génétique précise de leurs génotypes et/ou Assemblages.

I. Echantillonnage

I.1. Régions et sites d'étude

Pour réaliser ce travail notre choix s'est porté sur de nombreux sites aléatoirement sélectionnés dans la steppe algérienne. En Algérie, la steppe constitue une vaste région qui s'étend entre l'Atlas Tellien au Nord et l'Atlas Saharien au Sud, elle couvre une superficie de 20 millions d'hectare, formant un ruban de 1000Km de long sur 300 Km de large (Figure 8), réduite à moins de 150 Km à l'Est. Elle forme de grands espaces pastoraux traversés par des lits des oueds parsemés de dépressions plus au moins vastes et quelques masses des chaînes montagneuses isolées (Bencherif, 2011).

Notre échantillonnage s'est effectué précisément au centre de la steppe dans trois différentes régions, Laghouat, Djelfa et El-Bayadh. Ces trois régions représentent au mieux la steppe car elles sont des plus importantes en superficie et en effectifs d'animaux. C'est aussi un lieu de passage le plus emprunté par les transhumants (Bencherif, 2011).

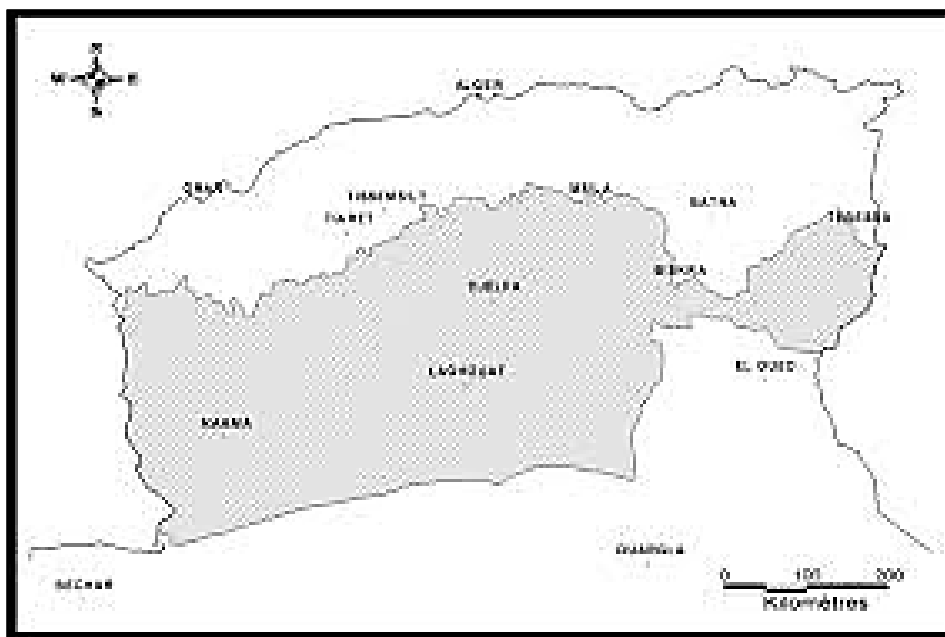


Figure 8: Situation géographique de la steppe algérienne (Nedjraoui, 2004)

Géographiquement les trois régions choisies au centre de la steppe algérienne se trouvent l'une contiguë de l'autre :

La région de Djelfa, comprise entre 2 et 5 de longitude Est et entre 33 et 35 de latitude Nord, est située au Nord de la steppe, au-delà des piémonts sud de l'Atlas Tellien dont le chef-lieu se trouve à 300Km de la capitale. Elle est limitée du Nord par les wilayas de Médéa et Tissemsilt, à l'Est par les wilayas de M'Sila et de Biskra, à l'Ouest par les wilayas de Laghouat et de Tiaret et au Sud par les wilayas de Ouargla, d'El Oued et de Ghardaïa.

Djelfa fait partie globalement de la steppe d'alfa mais il y existe aussi quelques steppes à armoise, de toute façon son couvert végétale est celui des hautes steppes semi-arides à hiver frais (Sba et Benrima, 2017 ; Bousaid *et al.*, 2018) avec des vides entre les touffes de végétation sur des sols généralement maigres en contact direct avec la roche mère, ce qui est tout à fait propices à l'activité d'élevage ovin-caprin. Les forêts occupent les chaînes de montagnes du Sénalba, du Djebel Azreg et du Djebel Boukahil (Bousaid *et al.*, 2018).

La région de Laghouat, quant à elle, est située à 400 Km au Sud de la Capitale d'Algérie, entre 33 de latitude Nord et 62 de longitude Est, Limitée au Nord Est par la wilaya de Djelfa, au Nord-Ouest par les wilayas de Tiaret et d'El-Bayadh et au Sud par la wilaya de Ghardaïa. Laghouat constitue avec de nombreuses autres wilayas la limite sud de la steppe. Elle est traversée au sud par la chaîne d'Atlas Saharien (D.S.A., 2008).

II. Méthodologie

Contrairement à Djelfa, 67 % des sols de la région de Laghouat forment des parcours sahariens, la zone à végétation est beaucoup plus restreinte elle est dominé par l'alfa, le romarin et l'armoise et quelques forêts est maquis éparses (D.S.A., 2008 ; D.P.A.T., 2011 ; D.S.A., 2014) qui constitue, tout de même, un environnement convenable pour l'élevage animal.

Et dans la région d'El-Bayadh, notre échantillonnage a été conduit dans les zones les plus peuplées par les animaux d'élevage. La région d'El-Bayadh se situe dans un espace limité en longitude par 0 et 2 Est et en latitude par 31 et 34 Nord. Elle est limitée par les wilayas de Saida et Tiaret au Nord, Laghouat et Ghardaïa à l'Est, Sidi Bel Abbés et Naâma au Sud-Ouest et enfin par Bechar et Adrar au Sud-Ouest et Sud-Est respectivement. L'espace d'étude parcouru au travers la région d'El-Bayadh dans la présente étude fait partie aux hautes plaines steppiques dont le couvert végétal est dominé par l'alfa, l'armoise blanche et le sparte (El Zerey *et al.*, 2009 ; Moulay *et al.*, 2012).

Les sites prospectés dans ces régions d'étude ont été choisis selon la proximité, l'abondance des élevages ovins, caprins et bovins et l'accessibilité et la permission accordée par les éleveurs ce qui a limité notre échantillonnage aux régions nord d'El-Bayadh, sud et sud-ouest du Djelfa et presque sur toute la région de Laghouat comme le montre la figure 9.

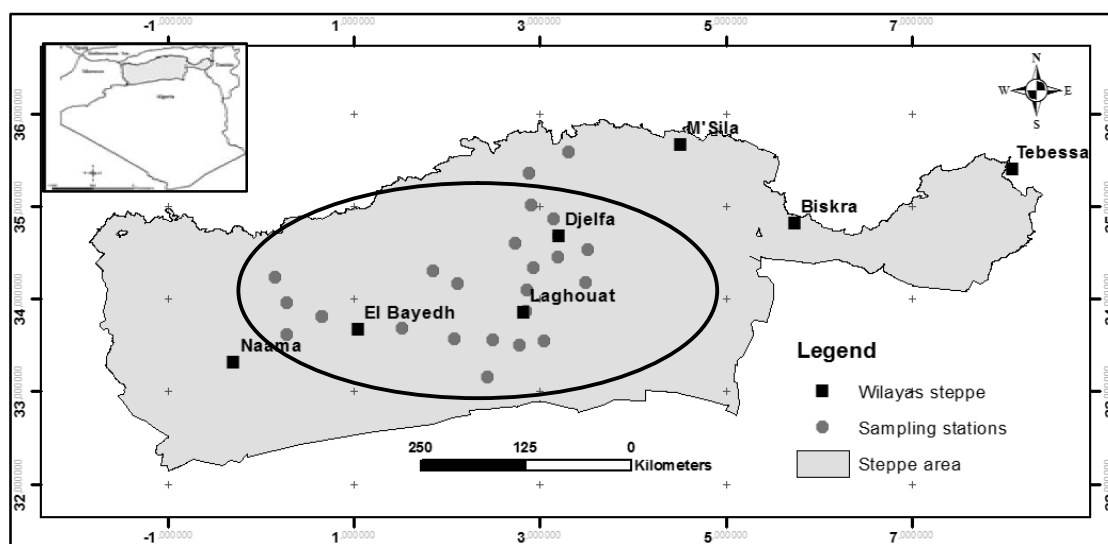


Figure 9 : Sites d'échantillonnage choisis dans la steppe centrale d'Algérie pour l'étude de *Giardia* et de *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage

(Carte téléchargée depuis <http://www.atlas-monde.net/afrique/algerie/> et traitée par MapInfo. Version 6.5., 2018)

II. Méthodologie

De nombreuses et différentes communes (sites) ont été visitées dans chacune des trois régions. Dans celle de Laghouat, de grandes distances ont été parcourues dans les communes d'El-Assafi, El-Houita, Hassi R'Mel, Bilil, Tadjmout, Ksar El Hirane, Ben Nacer Benchohra, Bordj Snoussi, Laghouat, Tadjrouna, Ain Madhi, Khneg, Baida, Ain Sidi Ali, Sebgag, Gueltet Sidi Saâd.

A Djelfa 18 communes en tout ont été explorées: Ain Oussara, Dar Chioukh, Had Shari, Messaâd, Zeccar, Ain El-Ibel, Mjedel, Charef, El-Idressia, Ain Maâbed, M'Liliha, Birine, Benhar, Djelfa, Taâdmit, Moudjebara, Zaafrane, Benhar.

Et dans la région d'El-Bayadh, le nombre des communes prospectés étaient beaucoup plus réduit, l'échantillonnage y était mené seulement dans les communes du Nord qui sont : Sidi Slimane, Sidi Taifour, Boualem, Sidi Ameer, Kaf El-Ahmar, Tousmouline, Rogossa, Bougtoub et El-Khayter.

I.2. Animaux et élevages étudiés

Trois espèces animales ont fait l'objet d'échantillonnage au cours de cette étude à savoir, ovin, caprin et bovin.

L'élevage dans nos sites d'étude constitue une activité ancestrale et traditionnelle d'une importance économique majeure notamment celui des petits ruminants dont les effectifs sont en nette augmentation depuis l'indépendance (Bencherif, 2011). En effet le cheptel animal en Algérie compte actuellement d'environ 28 millions de têtes d'ovin, 4.9 millions de têtes de caprin et 1.9 millions de têtes de bovin (Ministère de l'agriculture et de développement rurale, 2016. *In* Sahraoui *et al.*, 2019).

L'élevage des petits ruminants domine essentiellement dans les régions steppiques, d'environ 80% du cheptel national s'y trouve située selon Bencherif (2011).

Au total 1851 animaux ont été soumis à l'échantillonnage, dans le détail nous avons effectué 945 prélèvements chez l'ovin, 559 chez le caprin et 347 chez le bovin dans les trois régions enquêtées.

Le tableau 4 donne plus d'information sur les prélèvements réalisés dans chacune des trois régions et pour chaque espèce animale.

II. Méthodologie

Tableau 4: Les prélèvements collectés dans la steppe centrale d'Algérie en fonction de l'espèce d'élevage et des régions prospectées (2014-2018).

Région	Ovin	Caprin	Bovin	Total
Laghouat	356	215	173	648
Djelfa	318	250	98	666
El-Bayadh	271	94	76	444

Le nombre de fermes enquêtées varient d'une région à l'autre et même dans le même site, on en compte généralement, en moyenne d'environ 3 fermes par site. De chaque ferme, 10 échantillons en moyenne ont été prélevés, ce nombre n'a pu être atteint dans quelques cas surtout dans les fermes de bovins, là où les effectifs étaient très réduits. L'élevage pratiqué dans les fermes d'ovins est généralement de type extensif, dans de rares cas l'élevage est conduit à l'intensif car il est souvent d'un caractère traditionnel dans ces régions. Toutefois les élevages bovins et d'un degré moindre les élevages caprins y sont souvent de type intensif.

251 est le nombre des fermes prospectées au cours de notre échantillonnage dans les trois régions d'étude, toute espèce confondue, 107 fermes d'élevages ovins, 84 fermes d'élevages caprins et 60 d'élevages bovins ont été visitées respectivement au travers.

Le nombre de fermes dans chacune des trois régions et pour chaque espèce d'élevage est représenté dans le tableau 5.

Tableau 5: Les fermes enquêtées en fonction de l'espèce d'élevage et des régions prospectées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018).

Région	Ovin	Caprin	Bovin	Total
Laghouat	41	31	22	94
Djelfa	42	35	14	91
El-Bayadh	24	18	24	66

II. Méthodologie

I.3. Prélèvement et conservation

L'échantillonnage a été lancé du juin 2014 jusqu'à mai 2018, plusieurs sorties ont été réalisées dans les sites susnommés pour récolter le maximum d'échantillons.

Les échantillons étaient des matières fécales qui ont été prélevés directement à partir du rectum de l'animal à l'aide d'un gant avec ou sans excitation anale qui est réalisée souvent chez les jeunes notamment des petits ruminants, étant donné la difficulté du prélèvement chez ceux-ci (Figure 10). L'échantillonnage a été pratiqué indifféremment entre jeunes et adultes, mâle et femelles pendant toutes les saisons de l'année. Ces échantillons ont été misent ensuite dans un double volume de dichromate de potassium à 2.5% comme préparé dans l'annexe 2, dans des boites de 5 g au minimum. L'ensemble des échantillons ont été acheminés par la suite au laboratoire à l'intérieur des glacières isothermes comportant des sacs réfrigérants, pour l'analyse coproparasitologique.



Figure 10: Prélèvement et conservation des échantillons de fèces issus des animaux d'élevage de la steppe centrale d'Algérie (2014-2018) [Benhassine S., 2019]

Chaque prélèvement a été codifié selon la ferme et l'animal dont il est issu, on en cosignant le type d'élevage suivi, la région et l'âge des animaux prélevés. Les prélèvements fécaux récoltés de 945 ovins, 559 caprins et 347 bovins avaient été prélevés

II. Méthodologie

des animaux de différents âges. La répartition de nombre de prélèvements en fonction de l'âge figure dans le tableau 6.

Tableau 6 : Prélèvements fécaux collectés à partir des animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie en fonction de l'âge et de l'espèce d'élevage durant la période s'étalant de 2014 à 2018 (j : Jour, m : Mois).

Espèce d'élevage	1-7j	8-15j	16-21j	22-30j	1-3m	4-6m	7-11m	1 an	3-5ans	> 6ans
Ovin	38	43	41	124	305	133	74	60	106	21
Caprin	18	33	22	46	165	108	64	48	43	12
Bovin	06	03	01	24	103	24	40	35	94	17

II. Analyse de laboratoire

II.1. Analyses par approches classiques

Les échantillons de fèces ont été soumis en premier lieu à une analyse coprologique pour la mise en évidence directe de kystes et/ou d'oocystes des protozoaires *Giardia* et *Cryptosporidium*. Cet examen est nécessaire pour déterminer la prévalence parasitaire et réduire au cout de l'analyse moléculaire.

Avant de procéder aux examens coproscopiques, un échantillon supplémentaire de chaque prélèvement a été garde à 4 C° pour une analyse moléculaire ultérieure, lorsque l'analyse coproscopique se confirme positive cette échantillon sera sélectionné et remis au fond du réfrigérateur en attendant qu'il soit génotypé avec d'autre échantillons positifs. Les échantillons connus négatifs seront écartés et transporter à l'incinérateur pour qu'ils soient éliminés.

Le matériel utilisé pour l'analyse coprologique diffère selon que l'examen soit destiné à l'identification des parasites de *Giardia* ou de *Cryptosporidium*, les réactifs, la verrerie et les colorants appropriés pour chaque méthode sont illustré dans l'annexe 3.

À leur arrivée au laboratoire, les échantillons fécaux ont subi différents traitement. Tout d'abord, l'aspect de chaque prélèvement est relevé pour en déterminer la consistance, puis deux fractions en ont été prélevés, le premier est pour la réalisation de frottis et le deuxième sert à la concentration par flottation au sulfate de Zinc.

II. Méthodologie

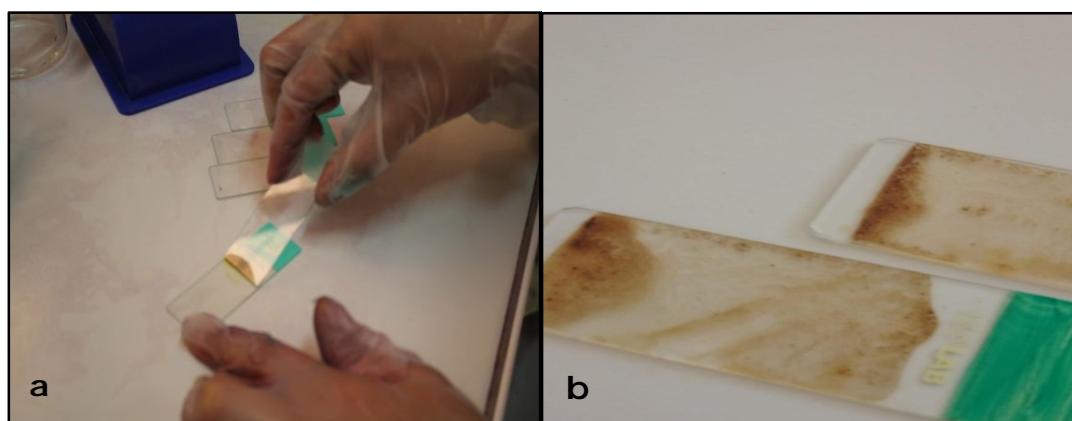
Mais avant toute analyse, l'élimination du conservateur est indispensable, pour ce faire nous avons procédé à la centrifugation de la suspension fécale à 1500 tours pendant 10 mn. Le surnageant correspond au dichromate de potassium a été éliminé par la suite, en laissant en culot la matière fécale qui va servir aux différents examens microscopiques.

II.1.1. Préparation des frottis et coloration de Zeihl-Neelsen modifiée (Henriksen et Polenz, 1981)

La mise en évidence directe des cryptosporidies est réalisée par la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, le choix de cet examen est fait selon les moyens mis à notre disposition dans notre laboratoire et le fait qu'elle soit la plus performantes dans le diagnostic coproscopique des cryptosporidies jusqu'à l'heure actuel (Khelef *et al.*, 2002 ; Smith, 2007).

Pour réaliser à cette coloration, la préparation des frottis a partir du culot des matières fécales doit se faire au préalable comme suite :

Les frottis ont été réalisés avec une petite quantité de matière fécale additionnée d'une goutte d'eau physiologique, le mélange est par la suite étalé sur une lame neuve et bien dégraissée à l'aide d'une deuxième lame inclinée d'un angle de 45°. Au terme de cette préparation, les frottis séchés à l'air libre ont été fixés par de l'éthanol absolu pendant 3 à 5 mn. Chaque lame a été numérotée au préalable selon l'échantillon qui lui correspond (Figure 11).



a. Etalement ; b : Fixation

Figure 11: Réalisation du frottis à partir d'un prélèvement fécal (Benhassine S., 2018)

Les frottis sont ensuite soumis à la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (mZn). Ils ont été donc colorés selon les étapes suivantes :

Immersion des lames dans la fushine phéniquée pendant au moins 1 heure ;

II. Méthodologie

Et rinçage sous un jet d'eau ;

Puis décoloration par l'acide sulfurique à 2 % pendant 20 s ;

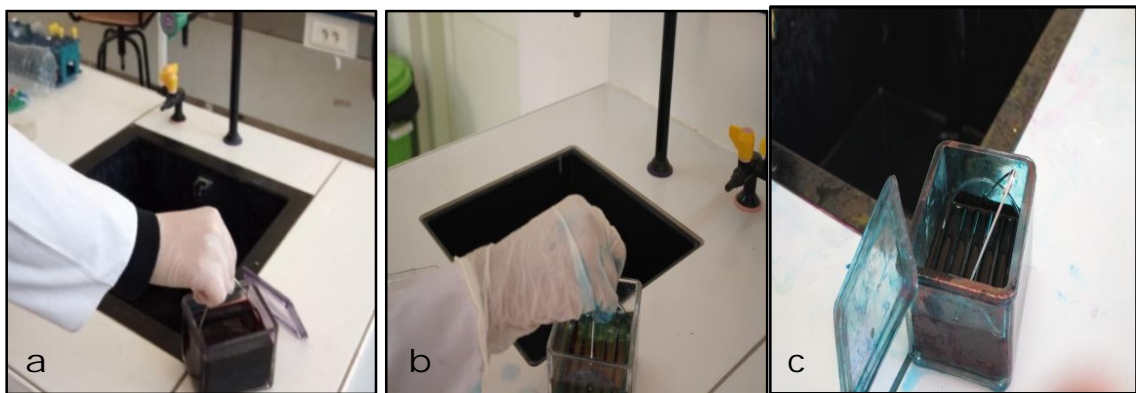
Suivi d'un deuxième rinçage sous jet d'eau ;

Ensuite contre-coloration par le vert de malachite à 2 % pendant 30 s à 1 mn ;

Et rinçage sous jet d'eau ;

Et enfin séchage des frottis et examen microscopique.

Les différentes étapes de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée sont illustrées en photos dans la figure 12.



a. Coloration à la fusine ; b : Différenciation ; c : Contre-coloration

Figure 12: Technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée en photos (Benhassine S., 2018)

II.1.2. Concentration par flottation au sulfate de zinc (Faust, 1938)

La concentration des matières fécales est nécessaire pour l'enrichissement de l'échantillon afin de pouvoir mettre en évidence les kystes de *Giardia*.

La technique choisie est celle de Faust (1938) car elle est considérée comme la meilleure dans la détection des kystes de *Giardia* selon ce qui ressortait de la bibliographie (Conboy, 1997 ; Zajak *et al.*, 2002). Pour cela la solution de sulfate de zinc à 33% (Densité 1.18) a été préparée selon le protocole présenté en annexe 4. Après l'avoir préparé, la solution de sulfate de zinc a été mise dans un flacon hermétiquement fermé, juste la solution de travail en était prélevée. Le flacon sur lequel la date de préparation y était mentionnée, est gardé au réfrigérateur pour des futures utilisations.

Chaque échantillon a été concentré selon les étapes suivantes et comme illustré dans la figure 13 :

II. Méthodologie

Après avoir homogénéisé l'échantillon de fèces, on en prélève 5g ;

Qu'on le fait délayer dans 20 ml de la solution de sulfate de zinc ;

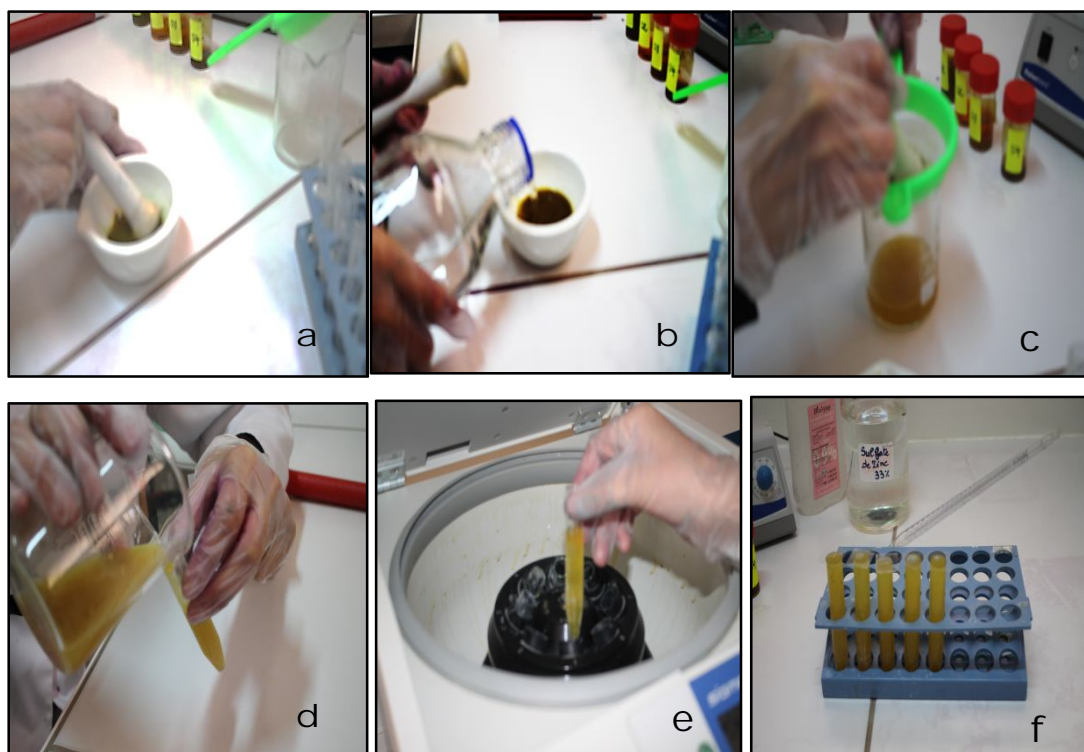
Puis tamiser le tout sur un tamis recouvert d'une gaze ;

Et remplir un tube à centrifuger avec 15 ml du filtrat obtenu jusqu'à former un ménisque au-dessus du tube ;

Recouvrir le tube d'une lamelle ;

Et le faire centrifuger à 1500 tours/min pendant 5 mn ;

Enfin déposer la lamelle sur une lame pour l'examiner au microscope.



a. Broyage mécanique des fèces, b. Remise en solution de sulfate de zinc ; c. Tamisage et élimination de débris ; d. Transfère en tube conique et formation du ménisque ; e. Centrifugation ; f. Dépôt des lamelles

Figure 13: Technique de flottation au sulfate de zinc à 33% en photos (Benhassine S., 2018)

II.1.3. Examen microscopique

L'examen microscopique à l'état frais est réalisé à l'objectif 10 pour voir la lame dans sa totalité, puis au 40 pour voir le détail de la structure interne (Espace périmembranaire, noyaux,...etc.) des parasites de *Giardia*. L'observation des lames colorées, est faite à l'objectif 40 au début nécessairement pour vérifier la présence d'éventuels oocystes cryptosporidiens, et pour la confirmation l'observation doit se faire à l'objectif

100, cette fois-ci additionnée de l'huile à immersion, afin de pouvoir les distinguer des faux oocystes.

II.2. Analyse par approches moléculaires

Après la mise en évidence des oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia* par les examens microscopiques conventionnels, dans les fèces des animaux d'élevage collecté lors de cette étude, les échantillons connus positifs ont été soumis aux analyses moléculaires par PCR et séquençage.

50 échantillons positifs révélés par les méthodes classiques (35 ovins et 15 caprins) dans un premier lot ont subi l'analyse PCR pour *G. intestinalis*, ces échantillons ont été tous issus de la région de Laghouat. Pour le deuxième lot, 45 échantillons positifs confirmés, soit 35 ovins et 10 caprins, de la région de Djelfa ont subi cette même analyse pour *Cryptosporidium spp.*

L'identification moléculaire par PCR des isolats de *Cryptosporidium spp.* issus des animaux d'élevage prospectés dans la présente étude a été rendue possible par l'amplification d'un fragment de 834 pb de la petite sous unité de l'ARN ribosomal (ssu ARNr) par PCR nichée suivie d'une RFLP des produits secondaires selon le protocole de Feng *et al.* (2007). Ce choix pourrait être justifié par les performances que présente cette méthode dans l'identification de la plupart des espèces cryptosporidiennes, et la facilité à développer les amorces qui cible de nombreuses espèces de *Cryptosporidium* à la fois (Xiao, 2010 ; Koehler *et al.*, 2014).

Pour le génotypage de *G. intestinalis*, il a été réalisé sur un fragment de 530 pb de gène triosephosphate isomérase (*tpi*) par PCR nichée selon le protocole décrit par Sulaiman *et al.* (2003). Bien que de nombreux autres gènes pourra être utilisés, notre choix pour le gène *tpi* est fait en raison de la forte hétérogénéité génétique de *Giardia spp.* à ce locus, il est capable de discriminer entre les différentes espèces et les Assemblages de *Giardia* (Sulaiman *et al.*, 2003).

Les échantillons conservés dans le dichromate de potassium ont subi différents traitements avant la caractérisation génétique des espèces des deux parasites selon les étapes décrites ci-dessous.

II. Méthodologie

II.2.1. Extraction d'ADN

Avant l'extraction de l'ADN on procède tout d'abords au lavage de nos échantillons fécaux pour éliminer le bichromate de potassium. Pour ce faire 4 à 5g de l'échantillon a été mélangé avec 40 ml de l'eau distillée et soumis à une centrifugation à 3600 rpm pendant 10 mn, deux fois consécutivement. Au terme de cette opération on obtient un culot fécale exempt de dichromate de potassium, cette étape a permet aussi de concentrer l'échantillon de matière fécale.

L'extraction de l'AND a été obtenue à l'aide des kits commerciaux FastDNA® spin kit for soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) en utilisant l'instrument FastPrep® 120 (Annexe 3) selon les instructions du fabricant comme décrits dans les étapes suivantes:

De chaque échantillon, 200 µl de culot a été transférés dans un tube à centrifuger de 2ml qu'on lui fait ajoute 978 µl de tampon phosphate de sodium (PBS) et on le fait transférer aux tubes lyse de matrice ;

Dans le FastPrep® on démarre le processus de lyse à une vitesse de 5.5 pendant 30s ;

Puis on centrifuge le mélange à 1400 rpm pendant 10mn pour éliminer les débris ;

Et on en Transfère le surnageant dans un tube propre de 1,5 ml on lui ajoutant 250 µl de réactif PPS (pyridin-propane-sulfonate), ce mélange doit subir une agitation 10 fois à la main ;

Et on le centrifuge de nouveau à 14,000xg pendant 5 mn ;

Ensuite transférer le surnageant, cette fois-ci, dans un tube conique de centrifugation propre de 15 ml ;

Et on lui ajoute 1 ml de la suspension de liaison de matrice qu'on la fait suspendre à l'aide de vortex avant l'utilisation ;

On place les tubes dans un agitateur pour permettre la liaison de l'ADN à la matrice ;

Et on les dépose dans un portoir pendant 5 mn pour permettre la décantation de la matrice de silice ;

II. Méthodologie

Après décantation on élimine 650 μ l de surnageant à l'aide d'une pipette, en prenant soin d'éviter la liaison avec la matrice décantée puis on remet en suspension la liaison de matrice au surnageant restant ;

Transférer la moitié de la suspension, d'environ 600 μ l, à un tube de capture à filtre SPIN™ et centrifuger à 14 000 x g pendant 1 mn. Videz le tube collecteur et ajoutez la suspension restante au filtre SPIN™ et centrifugez comme précédemment. Puis videz le tube de capture à nouveau ;

Ajouter 500 μ l d'un mélange formé de tampon de lavage (SEWS-M) et d'alcool, préparé selon la recommandation du fabricant, puis remettre doucement le culot en suspension en utilisant la force du liquide contenu dans la pointe de la pipette ;

Coupler cette étape à une centrifugation à 14 000 x g pendant 1 mn et jeter le contenu du tube de capture et le remplacer ;

Sans aucun ajout de liquide, centrifuger une seconde fois à 14 000 x g pendant 2 mn et remplacer le tube de capture par un nouveau tube propre ;

Pour éluer l'ADN remettre doucement en suspension la matrice de liaison au-dessus du filtre SPIN dans 100 μ l du tampon d'élution DES (Eau libre de DNase/pyrogène);

Et le faite centrifuger à 14 000 x g pendant 1 mn pour transférer l'ADN élué dans le tube de capture propre et jeter le filtre SPIN.

L'ADN est maintenant prêt pour l'analyse PCR. Il peut être Conservé à -20 ° C lorsqu'on prévoit l'analyser pour une période prolongée ou à 4 ° C pour une utilisation immédiate.

II.2.2. Analyse PCR

II.2.2.1. Préparation à la PCR

i. Mélange réactionnel

Avant de procéder à la PCR, la préparation d'un premix, appelée encore PCR Master mix, doit se faire au préalable dans les concentrations suivantes pour un volume total de 50 μ l (Volume réactionnel pour un échantillon):

- 10 \times Tampon (25 mM) PCR Perkin Elmer
- 1.25 mM de chaque dNTPs (Promega, Madison, WI).

II. Méthodologie

- 25 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI).
- 10 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma, St. Louis, MO)
- 5 U/μl ADN polymérase, GoTaq® (Promega, Madison, WI)
- 10 μM de chaque amorce
- Eau distillée

Le mélange réactionnel est formé de Master mix, l'échantillon d'ADN destiné à l'analyse et de l'eau distillée exempte de nucléase qui est utile pour ajuster le volume final à 50μl. Cependant les volumes des constituants de Master mix diffère selon qu'ils soient destinés à l'analyse de *Giardia* par *tpi* ou *Cryptosporidium* par 18S ARNr et même entre PCR primaire et secondaire (Annexe 5).

ii. contrôle de qualité

Il est également nécessaire de préparer le contrôle positif et le contrôle négatif :

- Le contrôle positif est l'ADN parasitaire pour la PCR primaire et les produits de la PCR primaire pour la PCR secondaire.
- Et le contrôle négatif est l'eau distillée quelle soit pour la PCR primaire ou la PCR secondaire.

iii. Amorces

➤ Pour *Giardia intestinalis*, les amorces choisies sont:

Amorce de la première PCR:

AL3543 avant (*tpi* F1) : 5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3'

AL3546 inverse (*tpi* R1) : 5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3'

Amorce de la deuxième PCR :

AL3544 avant (*tpi* F2) : 5'-CCCTTCATCGGIGGTA ACTT-3'

AL3545 inverse (*tpi* R2) : 5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'

➤ Pour *Cryptosporidium*, les amorces choisies sont :

Amorces de la première PCR :

LX1250 avant (18S F1) : 5`-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3`

LX1251 inverse (18S R1) : 5`-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3`

II. Méthodologie

Amorces de la deuxième PCR :

LX1252 avant (18S F2) : 5`-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3`

LX 1253 inverse (18S R2) : 5`-CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A-3`

II.2.2.2. Procédure de la PCR

i. PCR nichée

L'amplification de l'ADN par PCR nichée a été conduite dans un thermocycleur Perkin-Elmer GeneAmp PCR 9700 (Annexe 3). Cette opération s'est déroulée pour chaque échantillon selon les étapes suivantes :

On prépare la solution de mélange réactionnel de PCR en ajoutant PCR Master mix dans le tube approprié pour le mélange réactionnel ;

La bien mélanger au vortex et centrifuger pendant 5 s ;

Et puis dans un tube de 0.2 ml, on dépose 49 µl du mélange réactionnel pour la PCR primaire et 48 µl pour la PCR secondaire ;

Et on ajoute 1 µl de l'échantillon d'ADN dans la PCR primaire et 2 µl dans la PCR secondaire ;

Puis on centrifuge à 3100 rpm, l'ensemble des tubes, mélange réactionnel (Selon le nombre total des échantillons à analyser), contrôle négatif et contrôle positif

L'ADN parasite passent par différentes opérations dans le thermocycleur au cours de l'amplification de l'AND parasite : Dénaturation, hybridation avec les amorces et enfin l'élongation de la nouvelle molécule d'ADN. Le temps et la température dans le thermocycleur sont programmés selon le gène cible.

- Pour *Cryptosporidium* le cycle d'amplification est répété 30 fois selon le programme suivant : 94 C° pendant 30s, 55 C° pendant 30s, 72 C° pendant 60s. Avec un démarrage à chaud à 94 C° pendant 5 mn et une extension finale à 72 C° pendant 7 mn.
- Pour *Giardia*, le cycle d'amplification est répété 35 fois : 94°C pendant 45 s, 50°C pendant 45 s, 72°C pendant 60 s. Avec un démarrage à chaud à 94°C pendant 5mn et une extension finale à 72°C pendant 7 mn.

II. Méthodologie

ii. PCR-RFLP

Les produits de la PCR secondaire du gène 18S de l'ARNr de *Cryptosporidium spp.* ont été soumis à une digestion par l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) en utilisant 20 U des enzymes de restriction, *SspI* (New England BioLabs, Beverly, Mass.) et/ou *MboII* (New England BioLabs, Beverly, MA) selon les recommandations du fabricant :

Remettre en tube les enzymes de restriction dans un mélange formé de tampon de restriction et une eau distillée d'une manière à obtenir 30 µl du mélange réactionnel, les volumes de ces constituants diffèrent entre PCR-RFLP conduite par *SspI* ou *MboII* (Annexe 5) ;

Bien mélanger au vortex et centrifuger brièvement le tube pendant 5 s ;

Ajouter 10 µl des produits de PCR secondaire aux tubes de PCR contenant le mélange réactionnel ;

Fermer immédiatement chaque tube. Le volume total de la réaction de RFLP est maintenant de 40 µl ;

Mélanger brièvement par centrifugation et incuber à 37 C° pendant au moins 6 heures ou jusqu'au lendemain ;

Après incubation, centrifuger brièvement les tubes encore une fois.

N.B : Cette analyse a été refaite au moins deux fois pour chaque échantillon.

II.2.2.3. Révélation des produits de la PCR

Les produits issus de l'amplification de l'AND par PCR sont révélés grâce à la migration électrophorétique de leur séquences selon le principe suivant :

Sur le gel d'électrophorèse préparé comme décrit dans l'annexe 6 et recouvert d'une couche de 1-2 mm de TAE (Tris, Acétate, EDTA), on dépose 10 µl de marqueur de taille de 100 pb dans le premier et le dernier puits ;

Dans le reste des puits on incorpore un mélange de 2 µl de gel, 6×tampon de chargement ou et 10 µl de produit de la PCR pour chaque échantillon dans la PCR nichée ou 8 µl du Gel 6 x tampon de chargement pour chaque tube et 40 µl des produits issus de la PCR- RFLP;

II. Méthodologie

La séparation se fait conjointement au contrôle négatif et contrôle positif, à 10-11 volts/cm ;

Et enfin la révélation des bandes d'AND se fait après coloration par le colorant d'acide nucléique GelRed, (Biotium, Hayward, CA) sous la lumière UV avec transluminateur.

II.2.2.4. Lecture et interprétation des résultats

Sur l'électrophorégramme, lorsque les bandes d'amplification seront similaires à celle du contrôle positif, le résultat est considéré positif donc confirmé la présence des parasites. Si aucune bande n'est visible sur le gel à la zone correspondant à l'échantillon conformément au contrôle négatif, ou encore si la taille de la bande ne correspond pas au contrôle positif, le résultat est considéré négatif donc l'échantillon est exempt de parasite. Pour les résultats de PCR-RFLP, l'identification des espèces et/ou génotypes de *Cryptosporidium* se fait en se référant au modèles des bandes RFLP (Annexe 6) selon Xiao et Ryan (2007).

II.2.3. Séquençage

Pour confirmer l'identité des espèces identifiées, les produits de PCR secondaires du gène 18S de l'ARNr des espèces de *Cryptosporidium* et du gène *tpi* de *Giardia* ont été soumis au séquençage. L'analyse des séquences par assemblage et alignement permis de déterminer les espèces parasitaires sur la base de similitude avec les séquences de références de GenBank et le nombre de répétition de nucléotides. La procédure de séquençage se déroule en cinq étapes :

II.2.3.1. Purification des produits de PCR secondaire

Tout d'abord Charger 40 µl des produits de la réaction de PCR dans un puits individuel dans la plaque PCR MultiScreen HTS (Fisher Scientific) ;

Placer par la suite la plaque PCR MultiScreen HTS au-dessus de l'aspirateur MultiScreen ;

Et appliquer le vide à 25 pouces Hg pendant 10 mn ou jusqu'à ce que les puits soient vidés (20 mn) ;

Retirer la plaque de l'aspirateur et ajouter 20 µl de l'eau distillée pour chaque puits ;

Et Mélanger les échantillons vigoureusement sur un agitateur de plaque pendant 10 mn ;

II. Méthodologie

Enfin Transférer l'échantillon de chaque puits à son propre tube individuel (1,5 ml).

II.2.3.2. Réaction de séquençage

Avant de commencer la procédure, on prépare le mélange réactionnel et les amorces de séquençage (Les mêmes amorces de la seconde PCR). Pour chaque réaction de séquençage, le mélange réactionnel doit se préparer dans les proportions suivantes :

- 4 µl du tampon BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- 1 µl de BigDye Terminator BDT (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- 2 µl des amorces (40 ng/µl)
- 2,5 µl de l'eau

Ensuite ajouter 19,5 µl du mélange réactionnel dans chaque tube ;

Et 0,5 µl de produit de PCR purifiée aux tubes de 19,5 µl du mélange réactionnel ;

Et enfin exécuter le programme suivant : 25 cycles de 96°C pendant 10 s, 50°C pendant 5s, et 60°C pendant 4 mn et 1 cycle de trempage à 4°C.

i. Purification des produits de la réaction de séquençage

Pour réhydrater les colonnes de centrifugation Centrisep (Séparations Princeton, Adelphia, NJ), ajouter 0,8 ml d'eau, les bien mélanger au vortex et laisser hydrater pendant au moins 30 mn ;

Puis les soumettre à une centrifugation à 800xg pendant 3 mn, en élevant le bouchon du fond ;

Transférer par la suite 20 µl des produits de réaction de séquençage amplifiés sur le dessus du gel de chaque colonne ;

Et les faites placé dans des tubes simples puis les centrifuger à 800xg pendant 3 mn ;

A la fin faire sécher les échantillons dans une centrifugeuse sous vide.

II. Méthodologie

ii. Exécution du séquençage de l'ADN

On ajoute 15 µl de BigDye Formahide (HIDI) (Applied Biosystems, Foster City, CA) dans chaque tube d'ADN déshydraté ;

Et on transfère la suspension d'ADN dans chaque puits de la plaque de réaction MicroAmp optique 96 puits (Applied Biosystems, Foster City, CA) ;

Qu'on la fait couvrir avec le Septa plaque de 96 puits (Applied Biosystems, Foster City, CA) ;

Et chauffer à 94°C pendant 5 mn dans un thermocycler. Laisser refroidir la plaque à - 20°C pendant au moins 3 mn ;

La plaque est prête donc pour être chargée dans l'ABI analyseur 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pour le séquençage, en utilisant le programme approprié.

II.2.3.3. Analyse des séquences

La lecture des séquences générées sur les électrophérogrammes s'est faite par le logiciel ChromasPro v.1.5 (www.Technelysium.com.au/ChromasPro.html).

Ces séquences ont été assemblées à l'aide du logiciel ChromasPro, puis alignées les unes avec les autres avec les séquences de référence téléchargées à partir de GenBank à l'aide de ClustalX (www.clustal.org).

II. Analyse statistique

Les données obtenues ont été saisies dans Excel® 2007 (Microsoft, USA) et l'analyse a été réalisée à l'aide d'EXstat® 2014 (Microsoft, WA, USA). Pour l'étude de l'épidémiologie des deux parasites, la prévalence (p) de chaque parasite a été calculée comme suite: $p = d/n$, où d est le nombre d'animaux chez lesquels un parasite a été diagnostiqué et n = nombre d'animaux examinés. L'association entre les facteurs de risque (Age, type d'élevage, région d'étude et présence ou absence de diarrhée) et la prévalence parasitaire a été évaluée à l'aide de la statistique du chi carré (2). Les corrélations entre la prévalence et l'espèce d'élevage et la prévalence et la région d'étude ont été entreprises par le test d'ANOVA combiné au test du Turkey pour la comparaison multiple, on a eu recours à l'analyse par régression logistique pour déterminer la force d'association entre l'infestation parasitaire et certaines des espèces d'élevage. Dans toutes les analyses, le niveau de confiance est maintenu à 95% et $p < 0,05$ est défini pour la signification.

Chapitre III.

Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevages dans la steppe centrale d'Algérie

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

I. Etude par approches classiques

En Algérie l'étude de l'épidémiologie des deux parasites, *Giardia* et *Cryptosporidium* a été conduite davantage sur le bovin, notamment dans les régions nord du pays alors que leur épidémiologie chez les petits ruminants n'ont fait l'objet que de deux travaux réalisés par Baroudi *et al.* (2015) et Dahmani *et al.* (2017). Dans cette partie de travail on représente en chiffres la prévalence des parasites des genres *Giardia* et *Cryptosporidium*, chez trois espèces animales (Ovin, bovin et caprin) du centre de la steppe algérienne, et les résultats de l'étude de certains facteurs épidémiologiques en relation à ces deux parasites chez les animaux d'élevage de la région à savoir, l'âge, le type de l'espèce animale, la région et le type d'élevage ainsi que leur rôle dans les diarrhées chez ceux-ci.

I.1. Résultats des analyses coproscopiques

L'examen microscopique après flottation au sulfate de zinc pour *Giardia* et après coloration de Zeihl Nelsen pour *Cryptosporidium* a permis la mise en évidence des kystes et des oocystes des deux parasites comme illustrés dans les figures 14 et 15.

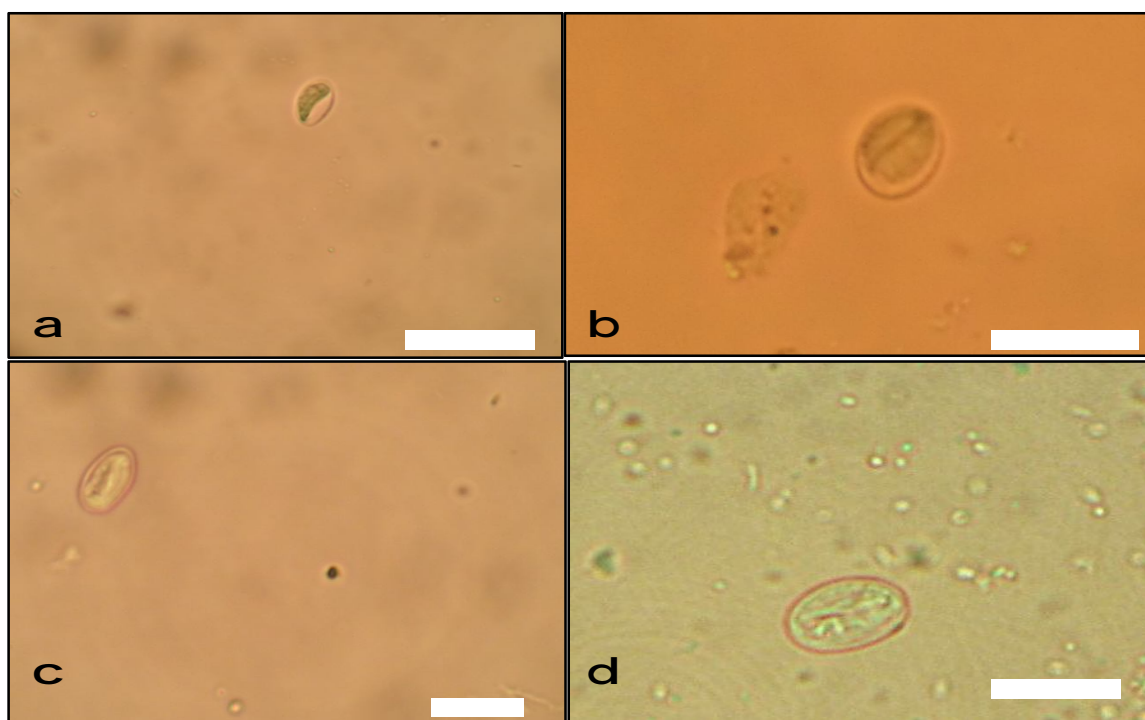


Figure 14 : Observation microscopique des kystes de *Giardia* spp. dans les fèces des animaux d'élevage de la steppe centrale d'Algérie après concentration par flottation au sulfate de Zinc 33% ; **a, b, c** : Kystes sans coloration ; **d** : kyste coloré au Lugol. Barre d'échelle= 10 μ m (Objectif \times 400) [Benhassine S., 2018].

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

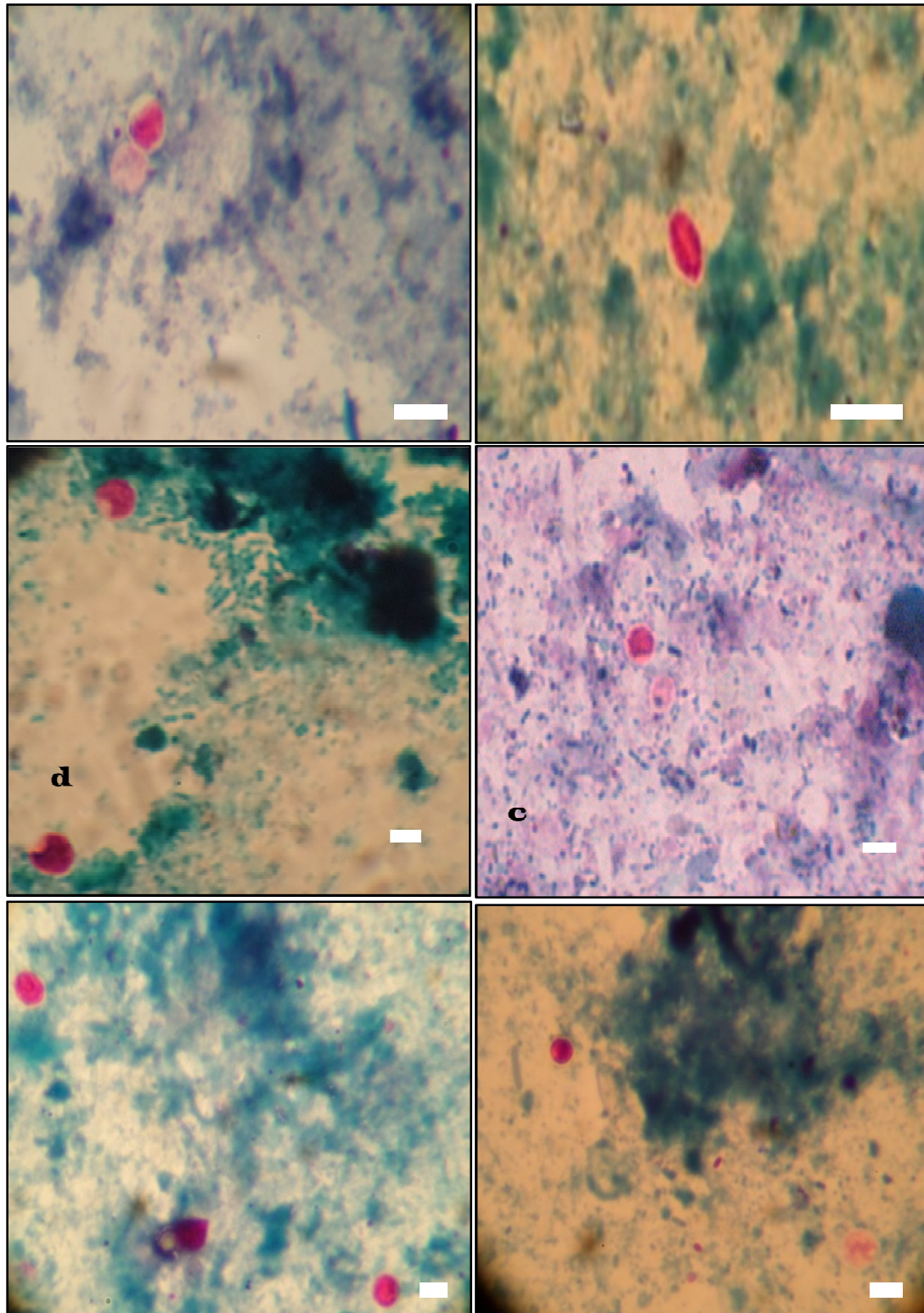


Figure 15: Observation microscopique des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans les fèces des animaux d'élevage de la steppe centrale d'Algérie après coloration au Zeihl-Neelsen modifiée. Barre d'échelle= 6µm (Huile à immersion, objectif×1000) [Benhassine S., 2018]

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

I.2. Résultats des analyses épidémiologiques

I.2.1. Prévalence

A l'issu de cette étude, les parasites de *Giardia spp.* et *Cryptosporidium spp.* se montre d'une fréquence assez faible chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie.

Chez le caprin, 19.30% des animaux se sont révélés positifs pour *Giardia* et 5.19% pour *Cryptosporidium*. Chez l'ovin, seulement 16.40% et 4.34 % ont été confirmé positifs pour les deux, *Giardia spp.* et *Cryptosporidium spp.* respectivement, ces taux se sont trouvés encore réduit chez le bovin, 8.9% ont été identifiés positifs en *Giardia* et 6.34% en *Cryptosporidium*.

Des résultats variables ont été obtenus d'un pays à l'autre pour *Giardia* , néanmoins les nôtres semblent faibles si on les compare à ceux issus des nombreuses études au travers le monde dont les prévalence varient de 23 à 42% chez l'ovin (Guerden *et al.*, 2008 ; Gomez-Munoz *et al.*, 2009 ; Robertson *et al.*, 2010 ; Tzanidakis *et al.*, 2014), de 19.8 à 44.4% chez le caprin (Castro-Hermida *et al.*, 2005b ; Castro-Hermida *et al.*, 2007a ; Geurden *et al.*, 2008 ; Carmena *et al.*, 2014 ; Cristanziano *et al.*, 2014; 2014; Surdé *et al.*, 2014 ; Tzanidakis *et al.*, 2014 ; Utaaker *et al.*, 2017) et de 30 à 49% chez le bovin (Berrilli *et al.*, 2004; Jager *et al.*, 2005 ; Hammes *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2014).

Généralement la prévalence de *Giardia* dans le monde peut être limité entre 1.5 et 55.6% pour l'ovin et entre 12.3 et 42.2% pour le caprin (Santin *et al.*, 2007 ; Robertson, 2009 ; Feng et Xiao, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012), ces valeurs se trouve comprises entre 9 et 73% chez le bovin (Geurden *et al.*, 2010 ; Ryan et Caccio, 2013) mais rares sont les études qui donnent des résultats aussi faibles chez les animaux d'élevage (Giangaspero *et al.* 2005 ; Bajer ; 2008 ; Kanyari *et al.*, 2009 ; Wegayehu *et al.*, 2013 ; Jafari *et al.*, 2014).

Quant au niveau national, l'étude des parasites de *Giardia spp.* à donner des prévalences variant de 7.14 à 27.5% chez les animaux d'élevage. Ils semblent plus répartis dans le nord du pays, à la région centre Baroudi *et al.* (2017) avaient isolé le parasite chez 27.45% des 102 veaux qu'ils avaient examiné dans 6 communes de la région d'Alger. Dans l'Est et l'Ouest du pays des valeurs respectives de 14.72% et 21.5% ont été enregistrés également chez le bovin par Moussa (2012) à Oran et Ouchene *et al.* (2014) à Sétif, ces valeurs sont largement supérieures aux résultats obtenus dans cette étude pour le bovin. Alors que pour l'ovin une prévalence de 7.14% est malheureusement la seule

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

valeur qui représente actuellement la giardiase en Algérie (Moussa, 2012), aucune étude n'a été effectuée sur le caprins à nos jours dans le pays, les données manquent à ce sujet. Toutefois on peut conclure grâce à nos aboutissements que la giardiase semble plus fréquente chez les petits ruminants en Algérie de ce qui est prévu.

En revanche, les travaux révélant la prévalence de *Cryptosporidium spp.* chez les animaux d'élevage en Algérie sont beaucoup plus nombreux, il en ressort que ces parasites sont largement répandus notamment chez le bovin dont l'infestation a atteint le seuil de 84% à l'échelle individuel et de 100% à l'échelle de troupeau dans certains endroits (Tableau 7). Mais il est à noter que la plupart des études ont été conduites dans les régions Nord. Il est de même que pour le caprin et l'ovin mais seuls les travaux de Moussa (2012), Baroudi *et al.* (2018) et de Dahmani *et al.* (2017) qui reflète la situation de la cryptosporidiose chez petits ruminants en Algérie, il semble que sa fréquence est nettement inférieure à celle de la cryptosporidiose bovine, le premier auteur a donné une prévalence de 28.57% chez l'ovin dans la région d'Oran dans l'Ouest, le deuxième avait obtenu une prévalence de 14.5% pour l'ovin et 8.7% pour le caprin dans le centre du nord du pays ce qui est en concordance avec les résultats de Dahmani, le troisième, qui trouvait une valeur de 14.6% pour l'ovin dans la région de Ain Oussera à Djelfa au centre de la steppe algérienne. Les résultats obtenus de cette étude se montrent largement inférieurs aux valeurs de la prévalence nationale.

Tableau 7: Prévalence de la Cryptosporidiose bovine en Algérie (2007-2018)

Prévalence	Région d'étude	Auteur et année de publication
16,97%	Est et centre	Khelef <i>et al.</i> (2007)
14,8%	Mitidja	Akam <i>et al.</i> (2007)
57,89%	Oran	Moussa (2012)
26,11%	Sétif	Ouchene <i>et al.</i> (2014)
13,72%	Alger	Baroudi <i>et al.</i> (2017)
84%	Batna	Benhouda <i>et al.</i> (2017)
52,2%	Nord central	Ouakli <i>et al.</i> (2018)

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Si nos résultats pour *Cryptosporidium spp.* chez les animaux d'élevage paraissent faibles de ceux issus de la majorité des travaux au niveau local, ils les sont encore plus faibles de ceux obtenus au niveau mondiale. En Tunisie, l'étude de Soltane *et al.* (2007) avait donné 86.7% de prévalence chez le bovin, pour cette même espèce d'élevage, Lefay *et al.* (2000) en France estime cette prévalence de 18% à 43%, alors que leur fréquence chez le caprin est de 11% et 35 % en Espagne (Matos-Fernandez *et al.*, 1993), de 55% à Sri Lanka (Noordeen *et al.*, 1999) et de 67.9% et 100% selon les travaux turcs et italiens (Sayin Ipek, 2017; Drumo *et al.*, 2012). Chez l'ovin elle est estimée à 19.2% en Espagne (Castro-Hermida *et al.*, 2007a) et peut atteindre le 26% selon les rapports australiens (Ryan *et al.*, 2005). Généralement la prévalence de *Cryptosporidium spp.* varie de 0 à 100% chez le caprin et le bovin et de 0 à 77% chez l'ovin (Robertson *et al.*, 2014).

Les prévalences réduites de *Giardia spp.* et *Crptosporidium spp.* décelées chez les animaux d'élevage de la steppe centrale en Algérie dans cette étude sont probablement la résultante de nombreux facteurs liés la conception de l'étude. Tout d'abord l'âge des individus prospecté dans ce travail n'a pas était limité aux jeunes seulement comme la plupart des études conduites à cet effet, notre échantillonnage a été aléatoirement pratiqué sur jeune et adulte ce qui diminue l'intensité parasitaire chez animal (O'Handley *et al.*, 2006; Hamnes *et al.*, 2006). On pourra l'expliquer d'autre part par le choix et les performances de l'outil diagnostique (Feng et Xiao, 2011 ; Robertson *et al.*, 2014, Majeed *et al.*, 2018) ainsi qu'au nombre des prélèvement soumis à l'examen pour chaque animal qui doit être testé plus d'une fois dans un intervalle de quelques jours, ce qui peut révéler davantage de faux négatifs (Olson *et al.*, 1997 ; Castro-Hermida *et al.*, 2007a ; Lim *et al.*, 2013 ; Fiuza *et al.*, 2011, Utaaker *et al.*, 2017). Dans nôtre étude les animaux ont été prélevés une seule fois et examiné avec les méthodes de diagnostic microscopique qui semblent moins sensibles que les méthodes d'immunodosage et de PCR (Robertson *et al.*, 2014, Majeed *et al.*, 2018).

D'autre facteurs sont aussi impliqués dans cette variation de prévalence qui sont la situation géographique, le fait de mener une étude ponctuelle ou longitudinal et le nombre des animaux et des fermes examinés (Xiao, 1994 ; Castro-Hermida *et al.*, 2005b ; Geurden *et al.*, 2010 ; Carmena *et al.*, 2014 ; Robertson *et al.*, 2014, Díaz *et al.*, 2018) qui diffèrent considérablement d'une étude à l'autre.

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

I.2.2. Etude des facteurs de risque

I.2.2.1. Age

La répartition des cas positifs en fonction de l'âge pour les deux parasites, *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie (Tableau 7 et 8), montre que les infestations à *Cryptosporidium spp.* apparaissent à un très jeune âge chez l'animal contrairement à ceux de *Giardia spp.* qui sont plus au moins tardives, à l'exception de l'ovin chez lequel l'infestation commence à 5 jours identiquement pour les deux parasites. Chez le bovin, l'infestation s'amorce à l'âge de 8 jours pour *Cryptosporidium* et à l'âge de 1 mois pour *Giardia* alors que pour le caprin, les animaux se sont révélés positifs dès l'âge de 9 jours pour *Cryptosporidium spp.* et à l'âge de 11 jours pour *Giardia spp.*

Dans notre étude, les deux parasites ont été identifiés dans la plupart des tranches d'âge chez l'ovin et le caprin. Toutefois ils se montrent plus forts chez les jeunes puis leur fréquence décline avec l'âge et ils rehaussent légèrement chez les adultes à plus d'un an, au-delà, le parasitisme devient moins intense (Tableau 8 et 9).

Tableau 8: Prévalence de *Cryptosporidium spp.* en fonction de l'âge chez les trois espèces d'élevage examinées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)

Tranches d'âge	Ovin			Caprin			Bovin		
	n	p	(%)	n	p	(%)	n	p	(%)
1-4J	10	0	0	03	0	0	03	0	0
5-7J	18	2	11,1	15	0	0	03	0	0
8-15J	43	4	9,3	33	7	21,2	03	1	33,3
16-21J	41	3	7,32	22	1	4,54	01	0	0
22-29J	124	8	6,45	46	7	15,22	24	2	8,3
1-3 M	305	6	1,97	65	4	6,15	103	10	9,71
4-6 M	133	2	1,5	108	5	4,63	24	0	0
7-12 M	74	6	8,1	64	3	4,69	40	0	0
1-2 ans	60	4	6,67	48	0	0	35	0	0
>2 ans	127	6	4,72	55	2	3,64	111	9	8,11

n : Nombre d'échantillons, p : Nombre de hôtes parasités, % : Pourcentage de positifs, J : Jours, M : Mois

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Pour *Cryptosporidium* on note généralement une infestation maximale entre l'âge de 8 à 30 jours chez les petits ruminants (Tableau 7). La relation âge-infestation pour *Cryptosporidium* est cependant significative seulement pour la tranche d'âge de 8 à 21 jours chez le caprin ($\chi^2=19.77$, $p=0.007$) et de 5 à 21 jours chez l'ovin ($\chi^2=28.15$, $p=0.02$). Chez le bovin, les cryptosporidies s'observent chez les jeunes moins de 3 mois seulement et l'infestation maximale se trouve entre l'âge de 8 à 30 jours ($\chi^2=11.76$, $p=0.038$). L'infestation réapparaît ensuite à l'âge adulte chez les bovin à partir de 2 ans tel représenté dans le tableau ci-dessus (Tableau 7).

Pour les infestations à *Giardia*, on note une infestation maximale entre l'âge de 21 jours à 6 mois chez l'ovin et le caprin. La relation entre l'âge et *Giardia* est cependant significative chez seulement les animaux ayant un âge compris entre 21 et 30 jours chez l'ovin ($\chi^2=9.82$, $p=0.044$) alors que chez le caprin aucune des tranches d'âge s'est montrées liées à l'infestation. Chez le bovin *Giardia* s'observe chez les jeunes moins d'un an mais l'infestation maximale est entre l'âge de 1 à 2 mois ($\chi^2=9.48$, $p=0.024$), puis l'infestation réapparaît à l'âge adulte, à partir de 2 ans comme le montre le tableau 9.

Tableau 9: Prévalence de *Giardia* spp. en fonction de l'âge chez les trois espèces d'élevage examinées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)

Tranches d'âge	Ovin			Caprin			Bovin		
	n	p	%	n	p	%	n	p	%
0-4J	10	0	0	03	0	0	03	0	0
5-7J	18	1	5,5	15	0	0	03	0	0
8-15J	43	6	13,95	33	2	6,06	03	0	0
16-21J	41	6	14,63	22	0	0	01	0	0
22-29J	124	37	29,84	46	5	10,87	24	3	12,5
1-3 M	305	57	18,69	65	19	29,23	103	22	21,36
4-6 M	133	30	22,56	108	14	12,96	24	2	8,33
7-12 M	74	3	4,05	64	2	3,12	40	2	5
1-2 ans	60	4	6,67	48	3	6,25	35	0	0
< 2 ans	127	11	8,66	55	5	9,09	111	2	1,8

n : Nombre d'échantillons, p : Nombre de hôtes parasités, % : Pourcentage de positifs, J : Jours, M : Mois

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Bien que l'infestation par *Cryptosporidium* spp. a été rapportée dans la littérature chez les animaux d'élevage dans toutes les tranches d'âge, sa fréquence et son intensité est âge-dépendante, les cryptosporidies sont beaucoup plus fréquents chez les jeunes moins d'un mois (Thompson *et al.*, 2005 ; Khelef *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2014 ; Bamaiyi et Redhuan, 2016 ; Naguib *et al.*, 2018) ce qui est conforme avec nos trouvailles pour l'ovin, le caprin et le bovin.

Habituellement, l'excrétion du *Cryptosporidium* chez le bovin commencent à l'âge de 2 à 6 jours (Thompson *et al.*, 2005 ; Robertson *et al.*, 2014) ou de 3 à 6 jours (De Graaf *et al.*, 1999). D'après nos aboutissements l'affection cryptosporidienne chez le bovin dans steppe centrale d'Algérie commence plus tardivement, à partir de 8ème jour, ce qui est également possible selon Robertson *et al.* (2014) qui le justifient par l'espèce parasitaire en cause, dans le cas où l'infestation est causée par *C. bovis* ou *C. ryanae* l'excrétion du parasite débute même à 10 jusqu'à 28 jours plus tard contrairement à *C. parvum* dont l'excrétion apparaisse depuis les premiers jours de vie de l'animal.

Dans cette étude, non seulement que le début de l'infestation cryptosporidienne qui est différent du commun, mais également l'âge dont le taux d'infestation est maximale en diffère, le parasite s'intensifie notamment chez les veaux ayant un âge de 8 à 1 mois ce qui n'est pas concordant avec les résultats de la plupart des auteurs qui le situe aux alentours du 14ème jour (Thompson *et al.*, 2005 ; O'Handley *et al.*, 2006; Akam *et al.*, 2007; Khelef *et al.*, 2007; Khodery et Osman, 2008). seulement quelques travaux qui l'ont décelé avec de fortes prévalences sur toute le période de 5 à 25 jours chez les trois espèces d'élevage (Maldonado-Camargo *et al.*, 1998 ; De Graaf *et al.*, 1999 ; Castro-Hermida *et al.*, 2002 ; Causapé *et al.*, 2002 ; Delafosse *et al.*, 2006 ; Brook *et al.*, 2008), nos résultats réconfortent les trouvailles de ces derniers.

Pour le caprin et l'ovin, l'excrétion des cryptosporidies est également précoce, elle commence à l'âge de 3 à 4 jours chez le premier et à l'âge de 2 à 7 jours chez le deuxième et elle devient maximale après seulement quelques jours à une semaine (De Graaf *et al.*, 1999; Causapé *et al.*, 2002 ; Rieux *et al.*, 2013 ; Robertson *et al.*, 2014). La cinétique de l'infestation cryptosporidienne chez les petits ruminants dans la steppe centrale d'Algérie ne semble pas obéir à la même logique, elle demeure intense un peu plus longtemps, jusqu'à 21 jour pareillement chez l'ovin et le caprin, et elle commence un peu plus tard cette fois ci chez le caprin seulement, chez lequel elle débute au 9ème jour à l'exemple

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

des résultats obtenus en France par Rieux *et al.* (2013) qui suppose que l'excrétion parasitaire chez cette espèce d'élevage peut commencer même à l'âge de 10 jours.

Il est nécessaire de savoir que le nombre des chevreaux d'âge de 1 à 7 jours et des veaux de 1 à 21 jours soumis à l'examen dans cette étude est faible, 18 échantillons dans le premier cas et 10 dans le deuxième, ce qui pourrait réduire également les chances de les trouver à un âge plus précoce.

Du même, pour *Giardia* spp., la forte infestation des jeunes des animaux d'élevage a été démontrée par de nombreux auteurs (Xiao, 1994 ; Bomfim *et al.*, 2005 ; Ruiz *et al.*, 2008 ; Feng et Xiao, 2011 ; Carmena *et al.*, 2012) principalement pour le bovin chez lequel l'infestation débute à partir d'un mois (Geurden *et al.*, 2010) puis elle se trouve intense entre la 5 et la 10 semaine en Asie et entre la 3 et la 10 semaine en USA (Xiao, 1994). Ces mêmes auteurs considèrent que l'infestation par *Giardia* spp. chez l'ovin ainsi que le caprin suit le même modèle que celui du bovin. Nos constats rejoignent ces auteurs pour les conclusions faites sur les bovins, mais elles diffèrent de ceux relatives aux caprins et aux ovins. La giardiase s'installe plus tôt, à partir du 5^{ème} jour, et elle dure plus longtemps, jusqu'à l'âge de 6 mois chez les petits ruminants dans la présente étude.

Bien que la relation entre l'infestation et cette tranche d'âge (1-6 mois) ne donne pas statistiquement de relation significative chez les petits ruminants de la steppe centrale algérienne, Swadi (2008) en Iraq et Castro-Hermida *et al.* (2005b) en France avaient démontré une forte infestation significative et prolongée chez les chevreaux chez lesquelles elle peut persister jusqu'à l'âge de 8 mois. Dans la présente étude l'infestation s'est montrée même incessante jusqu'à l'âge adulte notamment chez le caprin ce qui explique probablement son indépendance de l'âge chez l'animal dans la steppe centrale d'Algérie à l'exemple des résultats trouvés en Chine (Yin *et al.*, 2018).

La corrélation âge-infestation demeure à l'heure actuelle mal définie pour *Giardia* spp. chez les petits ruminants (Geurden *et al.*, 2010), de diverses études ont été conduites pour l'évaluer mais des résultats contrastés en découlent, certains cas de *Giardia* ont été rapportés chez les agneaux à partir de la deuxième semaine (Ozidal *et al.*, 2010 ; Sweeny *et al.*, 2011) alors que Xiao (1994) suggère que *Giardia* peut apparaître même plutôt, à 4 jours, ce qui le confirme les résultats du présent travail notamment pour l'ovin. De toute façon nos résultats peuvent conduire à penser que le modèle de la cinétique des infestations à *Giardia* spp. chez les petits ruminants est différents de celui du bovin. Elle

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

commence plutôt chez ceux-ci et dur plus longtemps avec un pic au alentour de la quatrième semaine chez l'ovin.

Pour expliquer à la sensibilité des jeunes aux infestations par *Cryptosporidium* et *Giardia*, le statut immunitaire précaire ainsi que la forte sécrétion des kystes et/ou oocystes chez les jeunes sont les causes majeurs qui prédisposent ces individus à ces pathogènes (Khelef *et al.*, 2007; Akam *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2010; Carmena *et al.*, 2012 ; Sudré *et al.*, 2012). Mais il n'est pas tout à fait clair pourquoi les infections à *Giardia spp.* ont tendance à survenir vers la fin de la période néonatale, alors que les infections à *Cryptosporidium spp.* se manifestent plus tôt chez les ruminants comme nous l'avons déduit de cette étude. Il a été suggéré que l'immunité passive protège initialement les jeunes ruminants des infections à *G. duodenalis* (O'Handley *et al.*, 2006).

Le caractère juvénile de l'infestation n'exclut pas la présence parasitaire chez les adultes des animaux d'élevage comme observé dans cette étude dans la steppe centrale d'Algérie et ceux conduites en Espagne, Canada, USA et la Norvège, ils ont tous montrés que les adultes d'ovin et de caprin peuvent être affectés par *Giardia spp.* (Castro-Hermida *et al.*, 2007b ; Olson *et al.*, 1997 ; Geurden *et al.*, , 2008 ; Robertson *et al.*, 2010) à l'exception de ceux menées en Brésil où les adultes en se sont démontré indemnes (Bomfim *et al.*, 2005 ; Sudré *et al.*, 2012). Des observations semblables ont été faites pour le bovin (Cacciò *et al.*, 2005).

Le portage du *Cryptosporidium spp.* par les animaux postes sevrés et les adultes apparemment sains a été également confirmé chez les petits ruminants (Majewska *et al.*, 2000 ; Ryan *et al.*, 2005 ; Castro-Hermida *et al.*, 2007a, Wang *et al.*, 2010 ; Koinari *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014 ; Mi *et al.*, 2014 ; Kaupke *et al.*, 2017, Diaz *et al.*, 2018) et les bovins (Castro-Hermida *et al.*, 2007b) dans de nombreux pays dans le monde.

Les études indiquent que les adultes qui portent *Giardia spp.* et *Cryptosporidium spp.* sont principalement les femelles autour de mise-bas et cela est due au changement dans l'immuno-réactivité des ruminants domestiques en fin de gestation et pendant la lactation (Xiao, 1994 ; Noordeen *et al.*, 2000 ; Castro-Hermida *et al.*, 2005a ; Geurden *et al.*, 2010 ; Rieux *et al.*, 2013), ils sont en faite des porteurs potentiels (Sari *et al.*, 2008) qui peuvent disséminer discrètement les parasites dans l'environnement.

L'apparition des parasites, *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les poste sevrés et adultes peut être liées encore au stress, statut nutritionnel de l'animal et les conditions

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

d'hygiène très souvent déplorables (Noordeen *et al.*, 2001 ; Khelef *et al.*, 2007) ou aussi à l'absence d'une immunité entièrement protectrice chez certains individus après la première infestation (Robertson *et al.*, 2014). Il est probable aussi que la contamination des animaux plus âgée soit la conséquence d'un élevage des animaux de différents âges dans des zones confinées (Khelef *et al.*, 2007 ; Raja Nur Rahifah, 2017) qui sont souvent fortement souillées par les parasites (Akam *et al.*, 2007 ; Ouchene *et al.*, 2014).

I.2.2.2. Type de l'espèce d'élevage

Chez les trois espèces animales, la prévalence de *Giardia* spp. a été trouvée toujours supérieures à celles de *Cryptosporidium* spp. probablement à cause de l'infestation beaucoup plus prolongée de *Giardia* par rapport à *Cryptosporidium* et qui devient même parfois chronique (Castro-Hermida *et al.*, 2007a). Mais lorsqu'on compare la prévalence entre les trois espèces d'élevage pour chaque parasite, il semble que *Cryptosporidium* spp. est plus fréquent chez le bovin ($p=0.001$) à l'opposé du *Giardia* spp. qui l'est plus chez l'ovin principalement ($p<0.0001$), l'ovin est en effet 2 fois plus à risque (OR=1.87, 95% CI : 1.25-2.78), suivi du caprin (OR=0.96, 95% CI : 0.6-1.57) (figure 16).

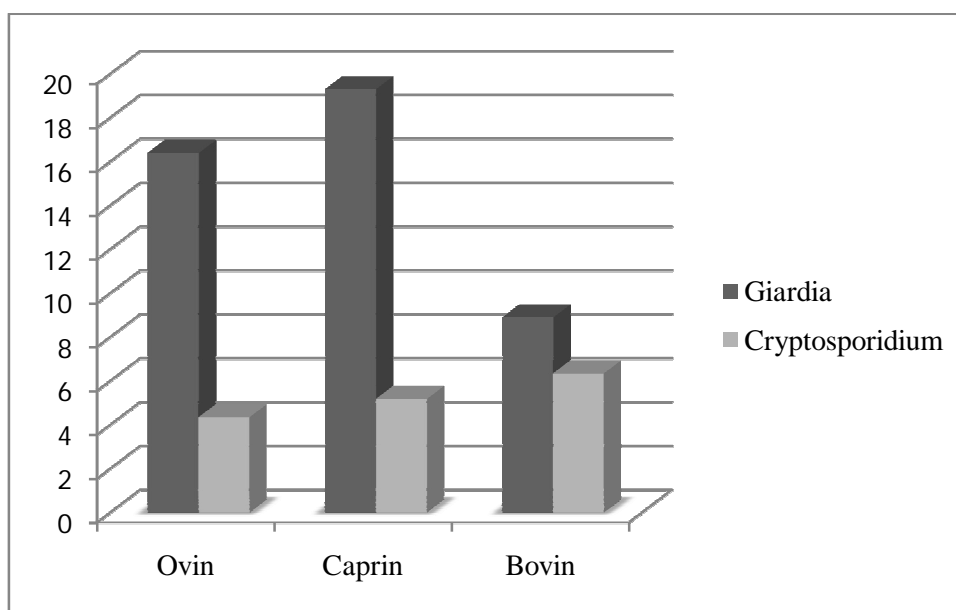


Figure 16: Prévalence de *Giardia* et de *Cryptosporidium* chez les trois espèces d'élevages examinées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)

Ces résultats suggèrent une forte réceptivité à *Giardia* de la part des petits ruminants comparativement au bovin dans la steppe centrale d'Algérie. Cette hypothèse

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

malheureusement ne pourra pas être vérifié et étendue à l'échelle nationale vu le manque des études évaluant cet effet en Algérie.

Mais les travaux qui révèlent la prévalence de *Giardia* spp. chez le bovin contre les petits ruminants essentiellement l'ovin bien qu'ils soient peu nombreux dans le monde, ils semblent en faveur à nos résultats. Au Canada, Buret *et al.* (1990) et Olson *et al.* (1997) trouvaient des taux beaucoup plus forts aux nôtres mais plus supérieurs chez l'ovin que chez le bovin. Ces résultats sont encore concordants aux études actuelles, tel est le cas des travaux menés par De Godoy *et al.* (2013) au Brésil qui rapportent une prévalence élevée chez l'ovin (30%) et le caprin (20%) contre le bovin (16.67%) pour *Giardia* spp. En Europe, Minetti *et al.* (2014) et Stojecki *et al.* (2015) enregistre des prévalences beaucoup plus élevés chez l'ovin par rapport au bovin, il semble que l'étude de Castro-Hermida *et al.* (2007b) en Espagne est la seule qui fait l'exception, ils trouvent que le taux de l'infestation par *Giardia* spp. est plus fort chez le bovin (26.6%) que le caprin (19.8%) et l'ovin (19.2%).

Si les petits ruminants semblent plus sensibles à *Giardia*, selon ce que nous avons obtenus de cette étude, le bovin, lui s'est avéré plus vulnérable à *Cryptosporidium* spp. La susceptibilité des bovins aux parasites de *Cryptosporidium* spp. chez ceux-ci est vraisemblablement connue.

En Algérie les résultats d'Ouchene *et al.* (2014) dans son étude sur les cryptosporidies chez le bovin à l'Est algérien fait paraître également une réceptivité supérieure à *Cryptosporidium* spp. chez celui-là, devant le caprin et l'ovin. Une réceptivité qui a été démontrée également par de nombreux auteurs dans le monde (Castro-Hermida *et al.*, 2007b ; Fayer, 2008 ; Wang *et al.*, 2010 ; Regassa *et al.*, 2013 ; Danladi et Ugbomiko, 2015 ; Bamaiyi et Redhuan, 2016). Cette forte prévalence constatée chez le bovin peut être la cause du mode d'élevage intensif qui favorise la proximité et le contact entre bovins dans les locaux d'élevage (Danladi et Ugbomiko, 2015). Toutefois, et selon les aboutissements des travaux de Giadinis *et al.* (2015) en Grèce et Delafosse *et al.* (2006) en France, le caprin pourra être plus sensible dans certains cas ou probablement dans certains pays.

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

I.2.2.3. Région d'étude

De l'étude de la répartition de nos deux parasites en fonction de la région d'étude, il semble que les animaux de la région de Laghouat sont les moins parasités en comparaison des deux autres régions, Djelfa et El-Bayadh.

La comparaison de cas de *Giardia* aux cas de *Cryptosporidium* en fonction de la région d'étude montre que les animaux de la région d'El-Bayadh présentent les taux les plus élevés pour les parasites de *Giardia* si on les compare à ceux enregistrés dans les deux autres régions, Laghouat et Djelfa. Alors que la fréquence des parasites de *Cryptosporidium* a été trouvée supérieure dans la région de Djelfa par rapport aux deux autres régions, Laghouat et El-Bayadh. Pour *Giardia* spp. Pour plus de détails le tableau 10 donne la prévalence pour *Giardia* et de *Cryptosporidium* en chiffres pour chaque espèce animale dans les trois régions d'étude.

Tableau 10: Prévalence de *Giardia* spp. et de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux d'élevage en fonction des régions d'étude prospectées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)

Région d'étude	Ovin		Caprin		Bovin	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
Laghouat	2,53	21,35	2,79	9,77	4,1	3,47
Djelfa	6,29	8,8	7,6	9,2	10,2	9,18
Bayadh	2,21	18,82	4,25	6,38	6,58	21,05

Les travaux entrepris au travers le monde pour l'étude de ces parasites ont donné des résultats contrastés d'une région à l'autre voire au sein de la même région (Robertson *et al.*, 2014 ; Qi *et al.*, 2015).

Bien que la steppe forme une région géographique unique, de variables microclimats y sont présents avec différentes caractéristiques climatiques. Chacune de nos trois régions d'étude est située dans un étage bioclimatique distinct, la région de Laghouat se trouve dans celui dont les conditions d'aridité et de température sont les plus fortes par contre les deux autres régions Djelfa et El-Bayadh font partie à des microclimats plus au moins favorable en humidité et température (Hammouda, 2009 ; Bencherif, 2011) ce qui pourrait expliquer les prévalences parasitaires réduites dans Laghouat par rapport à Djelfa

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

et El-Bayadh, car dans les endroits où la température et l'aridité sont extrême le maintien de ces parasites devient difficile (Green *et al.*, 2004 ; Hoar *et al.*, 2009).

Dans la steppe algérienne, les parasites de *Giardia* spp. et de *Cryptosporidium* spp. persistent pendant seulement 28 jours et 12 semaines à la température 20 C° (Moyen annuel de la température dans la steppe algérienne selon Le Houerou en 1995) respectivement, dans les fèces et le sol dans le milieu extérieur (Buret et Olson, 2001 ; King et Monis, 2005 ; Feng et Xiao, 2011). En outre, les oocystes de *Cryptosporidium* spp. s'altère beaucoup plus rapidement à des températures légèrement supérieures, 25-35 C° (Olson *et al.*, 2004 ; Fayer, 2004 ; King et Monis, 2005), condition que ce parasite rencontre dans la steppe en Algérie dans les saisons chaudes, ce qui réduit encore les chances de sa transmission aux animaux d'élevage dans ce milieu notamment dans la région de Laghouat qui est la plus chaude (Hammouda, 2009).

La variation de la prévalence entre les différentes régions d'étude dans notre travail et avec les différents résultats obtenus en Algérie est un cas analogue au Turquie, là où ils rapportent de très diverses fréquences pour *Cryptosporidium* spp. chez les agneaux diarrhéiques entre les différentes régions géographiques du pays (Sari *et al.*, 2008) et comme l'avait déclaré aussi Qi *et al.* (2015) pour le bovin dans la Chine. Du même, Danladi et Ugbomoiko (2015) avaient obtenus de résultats variables d'une région à l'autre pour le bovin. Ils ont tous incriminé le climat et la diversité des zones écologiques au sein des régions d'étude.

I.2.2.4. Type d'élevage

L'étude de la fréquence des infestations de *Giardia* et de *Cryptosporidium* en fonction du type d'élevage à montrer que *Cryptosporidium* est plus réparti chez les animaux élevés à l'intensif par rapport ceux élevés à l'extensif chez les trois espèces d'élevage examinées dans notre région d'étude. L'effet de type d'élevage sur la distribution de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage a concerné seulement les deux régions, Laghouat et Djelfa. Dans la région d'El-bayadh, cet effet n'a pas pu être déterminé car les échantillons collectés ont été prélevés tous des élevages extensifs (Tableaux 10, 11, 12). La relation entre les cryptosporidies et les animaux d'élevage se montre significative chez l'ovin ($\chi^2=7,4$, $p=0,07$), le caprin ($\chi^2=5,22$, $p=0,022$) et le bovin ($\chi^2=12,1$, $p=0,001$).

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Pour *Giardia*, bien que les cas recensés dans les élevages intensifs fussent supérieures aux cas des élevages extensifs (Tableaux 10, 11, 12), ce résultat semble statistiquement non-significatif. Le test de chi carrée à donner une valeur de p-value égale à 0.65 et 0.12 pour la relation entre le type d'élevage et les cas identifiés chez le caprin et l'ovin respectivement. La relation entre *Giardia* spp. et le type d'élevage chez le bovin était également nulle (p=0.87).

a. Cas de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans les élevages ovins en fonction de la région d'étude

Le tableau 11 représente le taux des fermes positives en *Giardia* et en *Cryptosporidium* dans les deux élevages intensifs et non-intensifs chez l'ovin dans les trois régions d'étude, il en paraît que ces deux parasites sont toujours plus fréquents dans les élevages intensifs notamment dans la région de Laghouat où cette différence semble plus marquée, seulement dans le cas de *Cryptosporidium* ($\chi^2=4.03$, p=0.044). Cette observation est statistiquement insignifiante dans le cas de *Giardia* dans cette même région ($\chi^2=2.46$, p=0.12). Alors que dans la région de Djelfa les deux parasites de *Giardia* ($\chi^2=0.062$, p=0.8) et *Cryptosporidium* ($\chi^2=2.84$, p=0.09) se montrent indépendants du type d'élevage, ils peuvent être aussi présents dans les élevages intensifs que les élevages extensifs dans cette région.

Tableau 11: Les fermes positives à *Giardia* spp. et les fermes positives à *Cryptosporidium* spp. chez l'ovin dans la steppe centrale d'Algérie en fonction du type d'élevage (2014-2018)

Type d'élevage	Parasite		Laghouat	Djelfa	El-Bayadh	Totale
Extensif	<i>Giardia</i>	p/n	10/24	10/29	11/24	31/77
		%	41.7	34.5	45.83	40.26
	<i>Cryptosporidium</i>	p/n	02/24	6/29	4/24	12/77
		%	8.33	20.69	16.66	15.58
Intensif	<i>Giardia</i>	p/n	12/17	5/13	ND	17/30
		%	(70.59%)	(38.5%)	ND	(56.70%)
	<i>Cryptosporidium</i>	p/n	6/17	6/13	ND	12/30
		%	(35.29%)	(46.15%)	ND	(40%)

n : Nombre des échantillons examinés ; p : Nombre de positifs ; % : Pourcentage ; ND: Non déterminé

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

b. Cas de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans les élevages caprins en fonction de la région d'étude

Pour le caprin, le tableau 12 donne des observations pareilles à celle faites chez l'ovin. *Cryptosporidium* spp. est fréquent dans les élevages intensifs en comparaison des élevages extensifs mais avec une relation significative seulement dans la région de Laghouat ($\chi^2=4,05$, $p=0,04$), à Djelfa, bien qu'il y une différence entre les deux types d'élevage, la relation semble faible entre l'infestation par *Cryptosporidium* spp. et le type d'élevage ($\chi^2=1,3$, $p=0,2$). L'infestation à *Giardia* spp. se montre également indépendante du type d'élevage chez le caprin dans les deux régions de Laghouat ($\chi^2=1,1$, $p=0,3$) et de Djelfa ($\chi^2=0,029$, $p=0,7$).

Tableau 12: Les fermes positives à *Giardia* spp. et les fermes positives à *Cryptosporidium* spp. chez le caprin dans la steppe centrale d'Algérie en fonction du type d'élevage (2014-2018)

Type d'élevage	Parasite		Laghouat	Djelfa	El-Bayadh	Totale
Extensif	<i>Giardia</i>	p/n	4/17	5/21	6/18	15/56
		%	23,53	23,81	33,33	26,78
	<i>Cryptosporidium</i>	p/n	01/17	3/21	4/18	8/56
		%	5,9	14,28	22,22	14,28
Intensif	<i>Giardia</i>	p/n	06/14	9/14	ND	15/28
		%	42,6	64,3	ND	53,57
	<i>Cryptosporidium</i>	p/n	04/14	11/14	ND	14/28
		%	28,57	78,60	ND	50

n : Nombre des échantillons examinés ; p : Nombre de positifs ; % : Pourcentage ; ND: Non déterminé

c. Cas de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans les élevages bovins en fonction de la région d'étude

Pour le bovin (Tableau 13), l'infestation à *Cryptosporidium* présente toujours les taux les plus élevés dans les élevages intensifs par rapport aux élevages extensifs dans les deux régions, Laghouat ($\chi^2=4,02$, $p=0,045$) et Djelfa ($\chi^2=0,5$, $p=0,48$) mais sans relation significative dans cette dernière. Le type d'élevage semble aussi indépendant de l'infestation par *Giardia* chez le bovin dans Laghouat ($\chi^2=0,08$, $p=0,78$) et Djelfa ($\chi^2=0,001$, $p=1$).

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Tableau 13: Les fermes positives à *Giardia* spp et les fermes positives à *Cryptosporidium* spp. chez le bovin dans la steppe centrale d'Algérie en fonction du type d'élevage (2014-2018)

Type d'élevage	Parasite		Laghouat	Djelfa	El-Bayadh	Totale
Extensif	<i>Giardia</i>	p/n	2/10	02/04	09/24	13/38
		%	20	50	37,5	34,21
	<i>Cryptosporidium</i>	p/n	01/10	02/04	03/24	06/38
		%	10	50	12,5	15,79
Intensif	<i>Giardia</i>	p/n	03/12	05/10	ND	08/22
		%	25	50	ND	36,40
	<i>Cryptosporidium</i>	p/n	06/12	06/10	ND	15/22
		%	50	60	ND	68,18

n : Nombre des échantillons examinés ; p : Nombre de positifs ; % : Pourcentage ; ND: Non déterminé

L'influence du type d'élevage sur la fréquence des cryptosporidies chez les animaux d'élevage a été démontrée par de nombreux auteurs à la fois au niveau national et mondial. En Algérie Dahmani *et al.* (2017) avait trouvé 92% des fermes positives dans les élevages d'ovin intensifs contre 68% dans les élevages extensifs à Ain Oussera dans la région de Djelfa ce qui conforte nos résultats, ces valeurs sont cependant inférieures à celles ce que nous avons obtenues dans cette même région et qui étaient de 50% vs 14,28% dans les élevages intensifs et extensifs respectivement. L'effet des pratiques d'élevages intensif sur l'augmentation des cas en *Cryptosporidium* en Algérie sont compatibles avec les données des travaux mondiaux sur les petits ruminants (Sari *et al.*, 2008 ; Raja Nur Rahifah, 2017 ; Yusof *et al.*, 2017). Cet effet est avéré aussi significatif chez le bovin (Harp *et al.*, 1995 ; Murakoshi *et al.*, 2012).

Il est claire que l'infestation devient forte lorsque les animaux sont logée dans les locaux d'élevage mais la mise à l'herbe des animaux sur de vastes étendus du pâturage n'épargne pas de l'affection, pour certains elle constitue un facteur de risque non négligeable, exposant les bovins à la cryptosporidiose (Bamaiyi et Redhuan, 2016) ce qui peut expliquer probablement le nombre de cas à *Cryptosporidium* dans les élevages extensifs enregistrés dans la présente d'étude.

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Contrairement à ce que nous avons conclu pour *Cryptosporidium*, l'influence du type d'élevage sur l'augmentation des cas à *Giardia* semble néant vu les résultats que nous avons obtenus et les aboutissements de quelques autres travaux conduits chez le bovin (Becher *et al.*, 2004 ; Hamnes *et al.*, 2006 ; Winkworth *et al.*, 2008 ; Menitti *et al.*, 2014), mais cet effet semble moins clarifiée chez les petits ruminants, Squire *et al.* (2018) nie l'effet du système d'élevage sur les infestations à *Cryptosporidium*, non seulement chez le bovin, mais également chez l'ovin et le caprin à Ghana. De toute manière cela n'exclut pas son effet définitivement, vu les conclusions faites par Geurden et Claerbout (2010), Sudré *et al.* (2012) et Akinkuotu *et al.* (2016) qui montrent que le système d'élevage est impliqué dans la variation de la prévalence de *Giardia spp.* chez les animaux d'élevage.

Si l'élevage intensif est favorable à la propagation ainsi qu'à l'infestation par les protozoaires parasites c'est parce que les animaux qui se trouvent concentrés dans des endroits fermés sont capables d'excréter les parasites avec un grand nombre qui avec l'introduction permanente de nouveaux animaux sensibles, ils exercent une pression parasitaire perpétuelle dans ces milieux confinés (Geurden et Claerbout, 2010), de plus la résistance remarquable de *Cryptosporidium* et *Giardia* aide à une longue survie de ces parasites dans ces milieux clos (Geurden *et al.*, 2010 ; Ryan et Caccio , 2013).

La présence de *Giardia spp.* et *Cryptosporidium spp.* indifféremment dans les fermes intensifs et extensifs dans la région de Djelfa pourra s'expliquer par les conditions d'hygiène dégradées dans cette environnement qui constitue le premier important dans l'élevage en Algérie et dont il est le plus emprunté par les animaux d'élevage, de vastes étendus sont donc souvent et continuellement souillé par les déjections animales dans les pâturages ce qui intensifie les parasites aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur dans les locaux d'élevage.

I.2.3. Statut clinique (Présence ou absence de la diarrhée)

I.2.3.1. Fréquence de *Giardia spp.* en fonction du statut clinique

De ce que nous avons obtenus de cette étude, *Giardia* semble moins impliquée dans les diarrhées chez les animaux d'élevage, leur fréquence étant proche entre les cas diarrhéiques et non diarrhéiques chez le caprin ($\chi^2=0,63$, $p=0,43$) et le bovin ($\chi^2=0,028$, $p=0,87$) comme illustré dans la figure 17. A l'exception de l'ovin chez lequel la diarrhée est significativement liée à l'infestation de l'animal par *Giardia* ($\chi^2=5,168$, $p=0,023$).

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

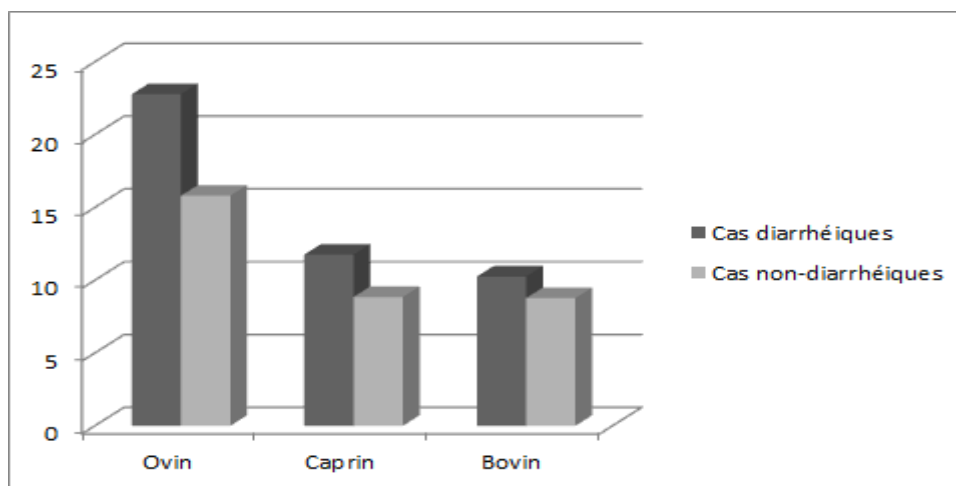


Figure 17: Fréquence de *Giardia* spp. chez les animaux d'élevage diarrhéiques et non-diarrhéiques dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)

Toutefois l'étude de la répartition des cas positifs à *Giardia* en fonction du statut clinique dans chacune des trois régions (Tableau 14) montre que la diarrhée est significativement liée à ce parasite seulement chez l'ovin de la région d'El-Bayadh ($\chi^2=23,51$, $P<0,0001$) et le caprin de la région de Djelfa ($\chi^2=5,76$, $p=0,001$), dans ces régions, *Giardia* semble donc pathogène. Pour le reste des cas, *Giardia* est inoffensif.

Tableau 14: Les cas positifs en *Giardia*. en fonction du statut clinique chez les animaux d'élevage examinés dans les trois régions étudiées dans la steppe centrale d'Algérie

Région	Statut clinique	Ovin			Caprin			Bovin		
		n	P	(%)	n	p	(%)	n	p	%
Laghouat	Diarrhéiques	25	04	16	07	00	00	10	00	00
	non-diarrhéiques	331	72	21,75	208	21	10,1	163	06	3,68
Djelfa	Diarrhéiques	35	03	8,57	08	02	25	21	02	9,52
	Non-diarrhéiques	283	25	8,84	242	21	8,7	77	07	9,1
El-Bayadh	Diarrhéiques	19	11	57,89	02	0	0	08	02	25
	Non-diarrhéiques	252	42	16,7	92	06	6,52	68	14	20,6

n : Nombre de cas examinés, p : Nombre de positifs, % : Pourcentage.

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Dans l'Ouest comme dans la steppe centrale d'Algérie, la giardiase est généralement asymptomatique ou au moins ne s'exprimant pas par une diarrhée selon également les travaux de Moussa (2012) sur le bovin et l'ovin. Ce qui est à l'encontre des observations faite par Baroudi *et al.* (2017) selon lequel *Giardia* spp. est un agent de diarrhée chez le bovin dans la région d'Alger.

Le bovin est avéré également sensible à *Giardia* spp. dans la Colombie britannique selon Olson *et al.*, (1997) où 47% des fèces des veaux diarrhéiques renferment les kystes de *Giardia* spp., et au Suède selon Björkman *et al.*, (2003) qui trouvait les parasites de *Giardia* avec une forte prévalence chez les bovins avec diarrhée. Mais le bovin n'est pas le seul qui en sensible, *Giardia* spp. est aussi trouvée avec une forte prévalence chez les agneaux diarrhéiques de plus de 15 jours dans la Turquie (Ozdal *et al.*, 2009), et elle s'est trouvée liée à la consistance des matière fécales des petits ruminants moins de 12 mois en Iran (Jafari *et al.*, 2014). Mais il est à noter que ces études ont été menées dans des régions différentes où les conditions d'élevage et les facteurs prédisposant de contamination ne sont certainement pas les mêmes que ceux de la présente étude.

L'existence de cas de diarrhée associés à *Giardia* spp. chez certains animaux dans certains sites dans les régions d'études enquêtées indique probablement que ce parasite favorise la diarrhée lorsqu'il agit avec d'autres pathogènes entériques et dont la présence n'a pas été révélé dans cette étude (O'Handley *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2010; Akinkuotu *et al.*, 2016), ou possibles encore à l'affection par de différentes espèces et/ou assemblages de virulence variable, la symptomatologie diffère chez les animaux d'élevage selon que l'Assemblage E ou l'Assemblage A et B soit en cause (Baroudi *et al.*, 2017).

Peu de travaux ont montré que *G. intestinalis* à le pouvoir de provoquer des signes cliniques notables (O'Handley *et al.*, 2006), de toute façon nos résultats sont en accords avec les travaux qui confirment que la giardiase n'a pas d'impact significatif sur l'état de santé des animaux d'élevage (Minetti *et al.*, 2014 ; Akinkuotu *et al.*, 2016).

I.2.3.2. Fréquence de *Cryptosporidium* spp. en fonction du statut clinique

L'effet de *Cryptosporidium* spp. sur l'état de santé des animaux d'élevage dans la steppe algérienne, quant à lui, se montre plus sévère. Le parasite a été identifié avec de fortes fréquences chez les animaux diarrhéiques comparativement aux animaux non-

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

diarrhéiques, la figure 18 donne les valeurs qui correspondent au taux d'infestation par *Cryptosporidium* chez les animaux diarrhéiques par rapport aux animaux non-diarrhéiques.

Cette relation s'est révélée hautement significative chez l'ovin ($\chi^2=21,83$, $p<0,0001$) et le bovin ($\chi^2=12$, $p=0,001$) de la steppe centrale algérienne, mais pas pour le caprin ($\chi^2=2,30$, $p=0,23$) dans cette région.

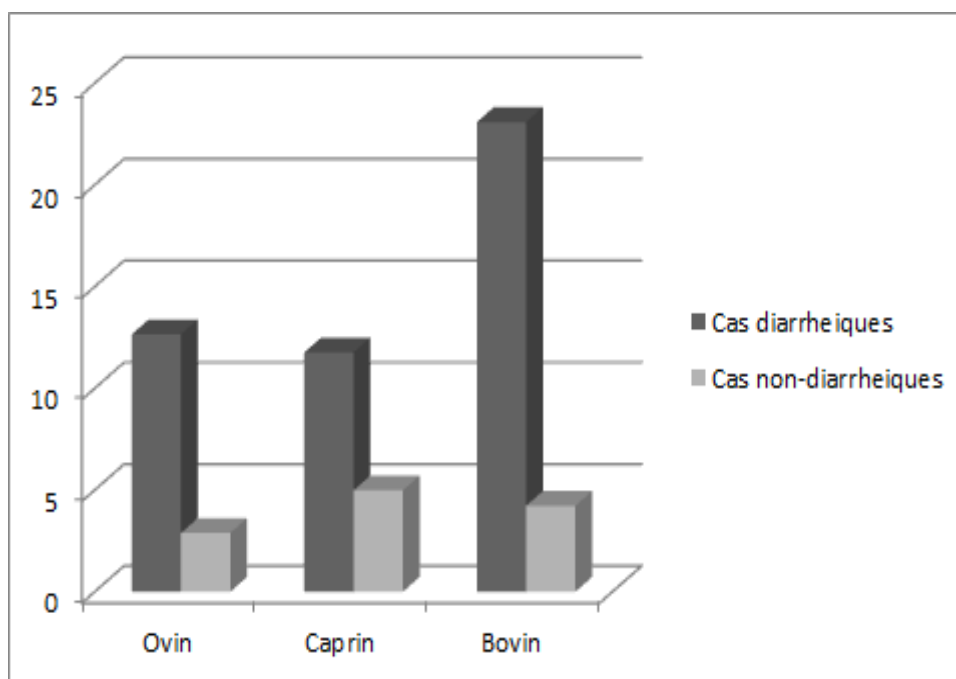


Figure 18: Fréquence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux d'élevage diarrhéiques et non-diarrhéiques dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)

A l'échelle de la région des résultats similaires ont été observés pour l'ovin dans Laghouat ($\chi^2=39,26$, $p<0,0001$) et El-Bayadh ($\chi^2=5,52$, $p=0,01$) mais pas à Djelfa ($\chi^2=0,23$, $p=0,63$), et pour le bovin à Laghouat ($\chi^2=0,12$, $p=0,008$) et à Djelfa ($\chi^2=10,56$, $p=0,001$) mais pas à El-Bayadh ($\chi^2=0,51$, $p=0,47$).

Alors que pour la relation de *Cryptosporidium* à la diarrhée chez le caprin elle s'est avérée nulle sauf dans la région d'El-Bayadh où elle se montre hautement significative ($\chi^2=45,98$, $p<0,0001$). Dans la région de Laghouat ($\chi^2=0,12$, $p=0,73$) et Djelfa ($\chi^2=0,54$, $p=0,46$), *Cryptosporidium* spp. ne semble pas avoir un impact sur l'animal. Le tableau 15 représente le nombre de positifs de *Cryptosporidium* et leur taux dans les cas diarrhéiques et non diarrhéiques dans chacune des trois régions d'étude et pour chaque espèce d'élevage.

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Tableau 15: Les cas positifs en *Cryptosporidium* en fonction du statut clinique chez les animaux d'élevage examinés dans les trois régions étudiées dans la steppe centrale d'Algérie (2014-2018)

Région	Cas	Ovin			Caprin			Bovin		
		n	p	(%)	n	p	(%)	n	p	(%)
Laghouat	Diarrhéiques	25	06	24	07	0	0	10	02	20
	non-diarrhéiques	331	05	1, 51	208	06	2,88	136	05	3,68
Djelfa	Diarrhéiques	35	02	5,71	08	00	0	21	06	28,57
	Non-diarrhéiques	283	18	6,36	242	19	7,85	77	04	5,19
El-Bayadh	Diarrhéiques	19	02	10,53	02	02	100	08	01	12,5
	Non-diarrhéiques	252	4	1,59	92	02	2,17	68	04	5,88

n : Nombre de cas examinés, p : Nombre de positifs, % : Pourcentage.

La pathogénicité des cryptosporidies dans les diarrhées néonatales fut bien établi par de nombreux auteurs dans le monde et cela même en l'absence d'autres agents entéropathogènes susceptible d'exacerber la maladie, pareillement chez les petits ruminants (Sari *et al.*, 2008 ; Khezri et Khezri, 2013 ; Papanikolopoulou *et al.*, 2018) et le bovin (El-khodery et osman, 2008 ; Majeed *et al.*, 2011).

les travaux effectués en Algérie témoignent la sévérité de la cryptosporidiose dans ce pays comme aux autres, les diarrhées en sont associées chez le bovin (Akam *et al.*, 2007; Ouchene *et al.*, 2012; Ouakli *et al.*, 2018), l'ovin (Dahmani *et al.*, 2017) et le caprin (Baroudi *et al.*, 2018) comme l'avait affirmé également nos résultats. Donc ces pathogènes sont des agents diarrhéiques des animaux du cheptel algérien dans toute son aire de répartition. Néanmoins cet effet est à vérifier chez les petits ruminants notamment dans la steppe, vu le nombre de cas réduit obtenu dans cette étude. La plupart des échantillons de matière fécale qui y sont collectés ont été prélevés à partir des animaux asymptomatiques ce qui diminue le nombre de positifs pour *Cryptosporidium* et empêche

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

d'étudier sa relation avec le statut clinique de l'animal et cela qui justifie probablement la faible relation *Cryptosporidium*-diarrhée chez le caprin.

Une autre explication de cette variation de l'impact sanitaire de *Cryptosporidium* sur les animaux d'élevage dans la steppe algérienne est liée à l'existence de différentes espèces et/ou génotypes d'une pathogénicité diverse, *C. parvum* souvent isolé chez les jeunes, est souvent des souches virulentes (Santin, 2003 ; Robertson *et al.*, 2014) alors que *C. xiaoi* et *C. ubiquitum* identifiés essentiellement chez les animaux plus âgées et adultes, elles sont plus au moins asymptomatiques (Rieux *et al.*, 2013 ; Robertson *et al.*, 2014). Les plus pathogènes sont peut être plus réparties chez l'ovin et le bovin et les moins pathogènes sont présents chez le caprins dans cette région.

De plus l'apparition tardive de ces parasites, comme constaté dans la présente étude (9 jours) chez le caprin, pourra être la cause de diarrhées moins sévères comme démontré chez l'ovin dans une étude expérimentale réalisée sur les nouveau-nés vs. les jeunes de 5–20 jours, et qui peut même être absente chez les animaux de plus d'un mois (Tzipori *et al.*, 1981 ; Rieux *et al.*, 2013)

En **conclusion** et au vu des résultats obtenus dans cette partie du travail, ce que l'on peut retenir est que les parasites de *Giardia* spp. et *Cryptosporidium* spp. sont d'une présence modeste chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie où elles présentent des taux assez important pour le premier par rapport au second chez ceux-ci.

Les parasites des deux, *Giardia* et *Cryptosporidium* sont âge-dépendante. Elles sont plus fréquentes chez les jeunes jusqu'à l'âge de 21 jours chez les petits ruminants et d'un mois chez le bovin dans le cas de *Cryptosporidium* spp., chez les quels elle s'amorce à la fin de la première semaine et/ou au début de la deuxième semaine. *Giardia*, quand à elle, elle apparait plus tardivement, 11 et 30 jours après la naissance chez le caprin et le bovin respectivement et un peu plutôt chez l'ovin (5 jours), puis elle devient intense vers la fin de la période de naissance et demeure encore assez fréquente jusqu'à l'âge de 6 mois, et cela chez l'ovin comme le caprin chez lequel *Giardia* semble indépendante de l'âge. Chez le bovin, l'infestation à *Giardia* est maximale entre 1 et 2 mois.

En conséquence, on peut dire que les ovins et les caprins seront plus à risque à l'infestation par *Cryptosporidium* jusqu'à l'âge de 21 jour et le bovin en serait jusqu'à l'âge d'un mois, alors que pour *Giardia*, les tranches d'âges à risque sont 8 à 30 jours pour l'ovin, 1 à 2 mois pour le bovin et pendant toute la vie du caprin.

III. Résultats et discussion: Etude de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

La présence de ces deux parasites est probablement défavorisée par le climat plus au moins aride que ces pathogènes rencontrent dans certains sub-climats dans la steppe, comme constaté à Laghouat. Les températures élevées et l'aridité sont donc des facteurs limitant au développement de ces parasites dans le milieu steppique.

Pour l'effet de type d'élevage souvent considéré influençant, il s'est avéré d'un impact notable dans les cas à *Cryptosporidium* spp. chez les animaux d'élevages dans la steppe centrale d'Algérie mais pas dans celle à *Giardia* spp. Les infestations à *Giardia* sont indépendantes du type d'élevage dans le milieu étudié.

Cette partie de travail fournit également une information sur l'impact sanitaire associé à ces parasites chez les animaux d'élevage de la steppe centrale d'Algérie, il a été montré que les cryptosporidies sont plus pathogènes que *Giardia* du fait que les cas diarrhéiques se sont avérés beaucoup plus liés à *Cryptosporidium* spp. qu'à *Giardia* spp. Toutefois il semble que cette dernière n'est pas tout à fait asymptomatique dans ce milieu, l'ovin de la région de El-Bayadh et le caprin de la région de Djelfa se sont montrés sensibles à *Giardia*. Donc d'autres études doivent être entreprises pour une meilleure compréhension de cet effet chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie.

III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

II. Etude par approches moléculaires

En Algérie l'étude de *Cryptosporidium* et *G. intestinalis* chez les animaux d'élevage a montré que les espèces zoonotiques sont les plus fréquentes pour le premier notamment chez le bovin (Baroudi *et al.*, 2017 ; Benhouda *et al.*, 2017 ; Baroudi *et al.*, 2018 ; Ouakli *et al.*, 2018) et moins fréquentes pour le deuxième chez les petits ruminants (Baroudi *et al.*, 2017 ; Sahraoui *et al.*, 2019).

Toutefois ces études ne peuvent permettre de généraliser la répartition des espèces majeurs décrites dans ces études chez les animaux d'élevage à l'échelle du pays essentiellement là où ils sont les plus abondant, et qui sont les régions steppiques en Algérie, 80% du cheptel national se trouve dans la steppe (Bencherif, 2011). Par conséquent le rôle zoonotique associé aux animaux d'élevage notamment les petits ruminants dans la transmission de *Giardia* et *Cryptosporidium* dans ce milieu est à l'heure actuelle méconnu.

Dans cet environnement les humains se trouvent en contact permanent et proches des animaux d'élevage dont l'effectif élevé accroît certainement le risque de transmission de ces pathogènes entre homme et animal, et pourtant les travaux qui ont été effectués pour l'étude des *Giardia* et *Cryptosporidium* chez ces animaux dans ce milieu sont rares.

Dans cette partie de travail on présente les résultats de l'identification moléculaire des espèces et/ou Assemblages des deux protozoaires intestinaux, *Giardia intestinalis* et *Cryptosporidium* spp. chez les animaux d'élevage dans la steppe en Algérie dans le but d'évaluer le potentiel zoonotique qui leur sont associés dans cet environnement.

II.1. Caractérisation moléculaire de *Giardia intestinalis* et *Cryptosporidium* spp. chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Sur les 50 spécimens soumis aux analyses moléculaires pour *G. intestinalis*, 21 seulement ont été séquencés avec succès, ce qui correspond à un taux de 42%. Aux détails, 15 de 35 ovins et 6 de 15 caprins, sont les isolats séquencés chez chacune des deux espèces d'élevage. Ces isolats sont tous issus d'une seule région d'étude qui est Laghouat au sein de la steppe centrale d'Algérie. Le résultat de l'analyse par PCR a permis l'identification de l'Assemblage E uniquement, pour tous les isolats séquencés, pareillement chez l'ovin et le caprin (Tableau 16).

III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Tableau 16: Génotypage de *G intestinalis* dans les échantillons d'ovin et de caprin issus de la région de Laghouat dans la steppe centrale d'Algérie.

Espèce d'élevage	Nbre des isolats soumis au PCR	Nbre des isolats génotypés	Fréquence de génotypage (%)	Assemblage
Ovin	35	15	42,86	E
Caprin	15	6	40	E

Un nombre d'isolats beaucoup plus réduit a été séquencé par PCR pour les espèces de *Cryptosporidium*, le taux de réussite en étant de 11.11% chez les animaux d'élevage dans la steppe algérienne. L'espèce identifiée est *C. xiaoi*, elle a été détectée seulement dans 5 échantillons sur un total de 35 ovins, qui sont tous issus de la région de Djelfa, pour le caprin aucun de 10 spécimens n'a pu être séquencé (Tableau 17).

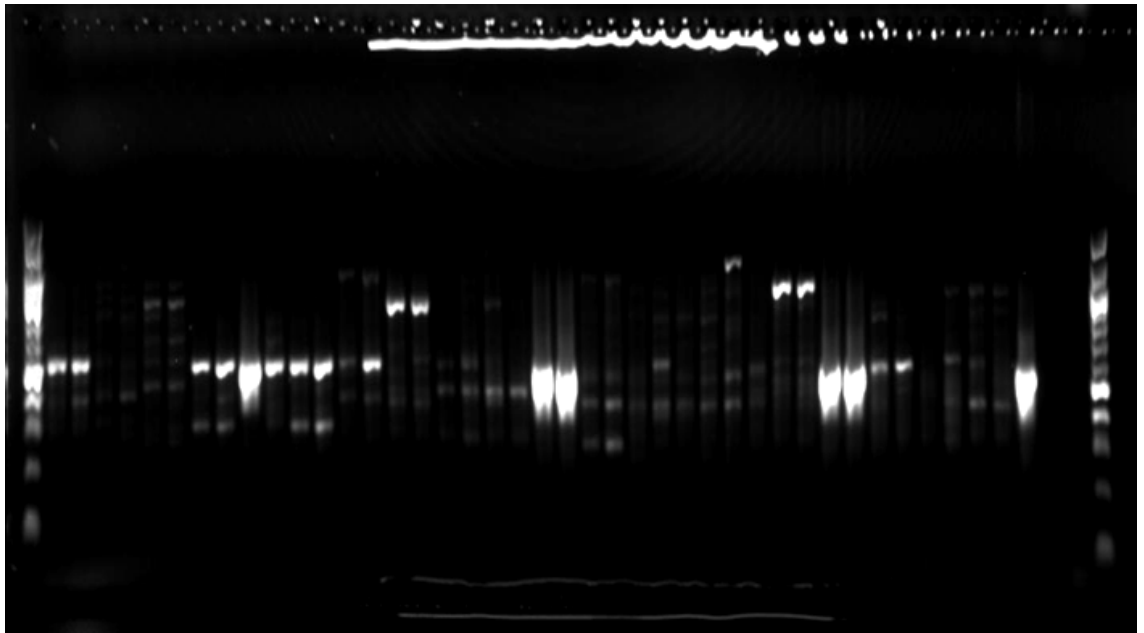
Tableau 17: Génotypage de *Cryptosporidium* spp. dans les échantillons d'ovin et de caprin issus de la région de Djelfa dans la steppe centrale d'Algérie.

Espèce d'élevage	Nombre des isolats soumis au PCR	Nombre des isolats génotypés	Fréquence de génotypage (%)	Génotype
Ovin	35	5	14,28	<i>C. xiaoi</i>
Caprin	10	0	0	<i>C. xiaoi</i>

Les photos des profils obtenues sur le gel d'électrophorèse après migration électrophorétique de produits de PCR de certains isolats positifs pour *G. intestinalis* et *Cryptosporidium* sont représentés dans les figures 19 et 20.

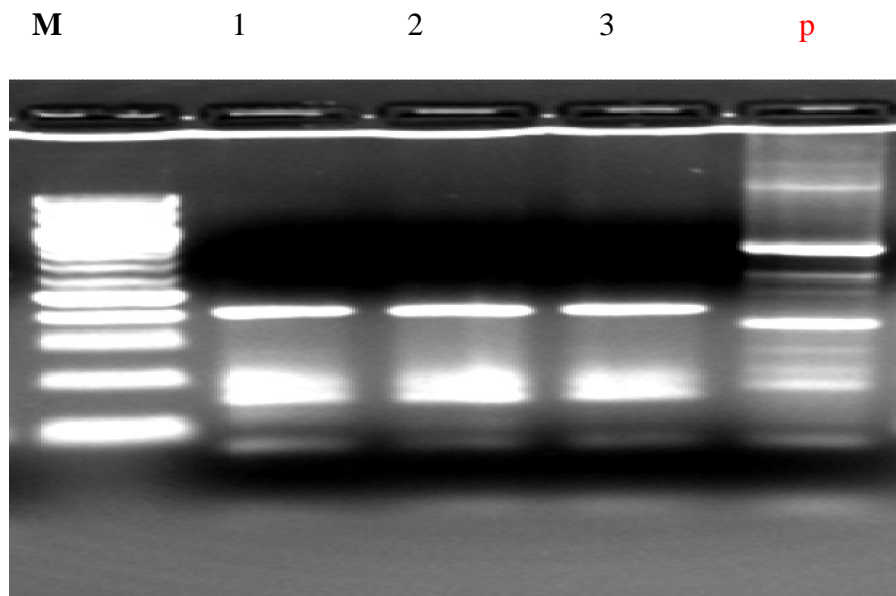
III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

M 12 34 56 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 p n1 n2 M



Echantillons rouges sont les échantillons positifs ; échantillons noirs sont les échantillons négatifs
p : contrôle positif ; n : contrôle négatif 1 ; n : contrôle négatif 2 ; M : Marqueur de taille

Figure 19: PCR-niché sur *tpi* montrant 13 échantillons positifs pour *G. intestinalis* (Assemblage E)



Echantillons positifs : 1, 2 et 3
p : contrôle positif ; M : Marqueur de taille

Figure 20: PCR-RFLP avec digestion par *MboII* des produits de PCR secondaires 18S ARNr, montrant 3 échantillons positifs pour *C. xiaoi*

III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

L'échec de l'amplification et/ou du séquençage de beaucoup des isolats des deux parasites au cours de l'analyse par les techniques de PCR dans la présente étude est probablement dû à la perte d'un certain nombre de parasites au cours du processus de purification et encore au nombre faible des parasites contenu dans l'échantillon au moment du prélèvement (Castro-Harmida *et al.*, 2007a ; Rieux, 2013), la plupart des échantillons examinés dans ce travail sont issus des animaux non diarrhéiques qui renferment incontestablement moins de oocystes et/ou kystes parasites, ce qui réduit les chances de les détecter dans les fèces (De Waele *et al.*, 2011) mais cela n'exclut guère l'effet des inhibiteurs du PCR contenus dans les matières fécales de l'hôte .

Selon certaines études, la sensibilité des techniques de biologie moléculaire (PCR) utilisées pour l'identification des espèces de *Cryptosporidium* spp. serait moins élevée lorsque l'extraction est faite directement à partir des matières fécales, l'ADN des cryptosporidies a été extrait directement des matières fécales, dans la présente étude. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au sein des matières fécales, de nombreuses substances peuvent inhiber ou interférer avec les PCRs (lipides, sels biliaires, polysaccharides) (Rieux, 2013).

L'inhibition de la molécule d'ADN n'est plus seulement réalisée par les particules compétitrices de matière fécale animale mais également par la solution de conservation, le dichromate de potassium qui est connu par ces performances dans la conservation des cellules viables de *Giardia* (Wilk et Robertson, 2009) s'est avéré inhibiteur lorsqu'il est mal éliminé au cours des processus de lavage précédant l'amplification d'ADN (Johnson *et al.*, 1995 ; Lalonde et Gajadhar, 2009 ; Kuk *et al.*, 2012 ; Abdelsalam *et al.*, 2017). Un lavage excessif est donc recommandé pour une meilleure reproductibilité de l'analyse PCR, mais cette opération pourra réduire encore le nombre de parasites dans l'échantillon (Lalonde et Gajadhar, 2009).

La condition de conservation diffère selon le parasite en question, la conservation idéale pour les espèces de *Cryptosporidium* semble être la congélation à -20C (Chen *et al.*, 2007 ; Abdelsalam *et al.*, 2017) contrairement à *Giardia* qui se conserve mieux au dichromate de potassium à 2.5 % (Kuk *et al.*, 2012) dans les matières fécales humaines. Dans notre étude les deux parasites ont été conservés dans le dichromate de potassium donc cela justifier le nombre réduit de des souches amplifiées et/ou séquencées par PCR pour *Cryptosporidium*.

III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

La durée de conservation semble également influençant (Lalonde et Gajadhar, 2009 ; Abdelsalam *et al.*, 2017), la conservation des oocystes cryptosporidiens, issus des eaux usées, dans le dichromate de potassium à 4 C se sont complètement altérés après une durée de plus de 12 mois (Johnson *et al.*, 1995 ; Jongwutiwes *et al.*, 2002) et au bout de 7 mois il a été constaté qu'à 4°C dans le dichromate de potassium à 2.5% provoque un endommagement significatif aux parois et d'ARNr de *G. intestinalis* (Bednarska *et al.*, 2007). Pour les isolats issus des échantillons positifs de *G. intestinalis* dans la région de Laghouat l'analyse a été conduite plus précocement, il s'est fait dans un délai de 5 mois contrairement à ceux de *Cryptosporidium* spp de la région de Djelfa, les analyse par PCR ont été conduite 15 mois après l'isolement, donc une chance moindre de les amplifier par PCR.

II.2. Potentiel zoonotique de *Giardia intestinalis* associé aux animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

L'infestation des animaux d'élevage par l'Assemblage E de *G. intestinalis* est clairement établi, il a été isolé avec une forte prévalence, une prevalence estimée à environ 75% chez l'ovin et le caprin dans le monde (Xiao et Fayer, 2008 ; Robertson, 2009 ; Sprong *et al.*, 2009 ; Ryan et Caccio, 2013, Chen *et al.*, 2019) et parfois à 100% comme c'est le cas de la présente étude et d'autres notamment dans l'hémisphère sud du globe terrestre (Ruiz *et al.*, 2008 ; Hossain *et al.*, 2014 ; Jafari *et al.*, 2014 ; Paz e Silva *et al.*, 2014 ; Sudré *et al.*, 2014 ; Al-Habsi *et al.*, 2017 ; Squire *et al.*, 2018Wu *et al.*, 2018 ; Johnston *et al.*, 2010 ; Di Giovanni *et al.*, 2006).

Selon Squire et Ryan (2017) cet Assemblage est le plus réparti chez les animaux d'élevage en Afrique. En effet, l'Assemblage E a été isolé avec de forte prévalence chez l'ovin en Algérie (Baroudi *et al.*, 2015 ; Sahraoui *et al.*, 2019), toutefois les résultats de ces derniers ont montré l'existence d'un autre Assemblage, l'Assemblage zoonotique A , à côté de l'Assemblage E chez les animaux d'élevage dans le pays.

La présence de l'Assemblage A chez les animaux d'élevages a été également démontrée par de nombreux auteurs au travers le monde (Caccio et Ryan, 2008 ; Geurden *et al.*, 2008 ; Santin *et al.*, 2008 ; Gomez-Munoz *et al.*, 2009 ; Sprong *et al.*, 2009 ; Robertson *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Di cristanziano *et al.*, 2014 ; Minetti *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2015) notamment chez le bovin qui y semble plus réceptif comparativement à l'ovin et le caprin (Xiao et Fayer, 2008 ; Budu-Amoako *et al.*, 2011 ;

III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Feng et Xiao, 2011) donc cela pourra justifier, en partie, l'absence de l'assemblage A chez les petits ruminants dans la région de Laghouat au centre de la steppe algérienne mais malheureusement ne pourra pas le confirmer pour toute la steppe et le cheptel y pâturent vu le nombre réduit des spécimens séquencés et l'aire géographique réduite prospectée pour de tel effet dans notre étude. Une autre explication est liée aux gènes utilisés pour le génotypage, il a été montré que *tpi* et *gdh* sont de faible sensibilité dans la discrimination entre A et B par PCR ce qui est à l'origine de différence de prévalence entre ces deux assemblages dans les études épidémiologiques (Gomez-Munoz *et al.*, 2012 ; Ryan et Caccio, 2013).

Dans la transmission zoonotique de *Giardia intestinalis*, à partir des animaux d'élevage, les Assemblage A et B ont été souvent les plus incriminés (Keulen *et al.*, 2002). Toutefois, l'Assemblage E supposé exclusivement animal s'est avéré, lui aussi, zoonotique dans certaines circonstances (Foronda *et al.*, 2008 ; Sprong *et al.*, 2009 ; Lim *et al.*, 2013 ; Fantinati *et al.*, 2016 ; Squire *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2019), dans l'étude de Zahedi *et al.* (2017) les enfants vivants avec un effectif important de bovin dans les régions rurales d'Australie étaient les plus touchés par *G. intestinalis* de l'Assemblage E. Du même qu'en Egypte cet Assemblage a été isolé chez les jeunes dans les régions agricoles du pays (Abdel-Moein et Saeed, 2016), donc probablement la fréquence du contact aux animaux d'élevage accroît les risques d'atteinte de l'homme par cet Assemblage.

Bien que la voie de transmission zoonotique de *G. intestinalis* via les animaux semble limitée selon certains (Robertson, 2009 ; Heyworth, 2016), il est possible que dans des environnements où les humains et les animaux sont en contact étroit, cette transmission pourra s'amplifier du fait que certains Assemblages isolés uniquement chez les animaux se sont avérés également zoonotique, comme se passe probablement dans la steppe algérienne dont le pastoralisme forme la première activité pratiquée par une importante fraction de sa population, mais sans la caractérisation moléculaire des isolats d'origine humaine ces constats demeurent hypothétiques. Bien qu'on ne peut pas confirmer l'effet zoonotique supposé, l'existence de l'Assemblage E chez les animaux de la steppe algérienne peut être menaçant à la population humaine dans cet environnement .

III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

II.3. Potentiel zoonotique de *Cryptosporidium* spp. associé aux animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

Le génotypage de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux d'élevages en Algérie a concerné essentiellement l'espèce bovine chez laquelle les espèces zoonotiques, *C. parvum* et *C. bovis* se montre dominant, l'une dans le centre (Baroudi *et al.*, 2017 ; Ouakli *et al.*, 2018) et l'autre dans l'est du pays (Benhouda *et al.*, 2017). Les recherches ayant pour but le génotypage des cryptosporidies chez les petits ruminants en Algérie ont été beaucoup plus réduites et même rare chez le caprin.

La présence de *C. xiaoi* chez l'ovin dans la steppe algérienne est en accord avec les résultats de Baroudi *et al.* (2018) chez cette même espèce d'élevage dans les régions centre au nord du pays, il l'avait isolé avec un taux de 61% à côté de *C. parvum* dont le taux de fréquence était de 39%, dans cette même étude le caprin s'est avéré parasité par *C. xiaoi* (75%) et *C. ubiquitum* (25%). Paradoxalement, *C. parvum* s'est trouvé dominant chez 76% du total d'ovins examinés dans l'étude de Sahraoui *et al.* (2019) qu'elle avait conduite dans différentes régions dans le pays. L'explication de différence dans la répartition des espèces de *Cryptosporidium* et leur taux qui semble contradictoire chez les espèces d'élevage en Algérie peut être liée à la variation spatiale ainsi qu'à la différence des pratiques d'élevage d'une région à l'autre (Benhouda *et al.*, 2017, Ouakli *et al.*, 2018), il est en fait connu que la distribution des espèces de *Cryptosporidium* diffère selon la région géographique non seulement en Algérie mais dans de nombreuses autres régions dans le monde (Robertson, 2009 ; Mi *et al.*, 2018).

De toute façon, il semble que les petits ruminants en Algérie constituent des hôtes majeurs à *C. xiaoi* ce qui est aussi le cas dans certains pays dans le monde, à l'instar de l'Australie, Pologne, la Chine, la Tunisie et l'Égypte (Yang *et al.*, 2015 ; Kaupke *et al.*, 2017, Mi *et al.*, 2018 ; Soltane *et al.*, 2007. In Fayer et Santin, 2009, Mahfouz *et al.*, 2014), ce résultat est conforme également au modèle africain, les pays africains représentent une aire géographique à forte répartition à *C. xiaoi*, chez les petits ruminants (Squire et Ryan, 2017). Bien que cette espèce est plus fortement répartie chez les animaux d'élevage, on ne peut pas exclure des petits ruminants du spectre d'hôtes à transmission zoonotique en Algérie. Surtout qu'ils sont fortement suspects dans d'autres régions dans le monde du fait qu'ils soient porteurs de espèces potentiellement zoonotiques, *C. parvum* et/ou *C. ubiquitum*, chez lesquels ils présentent une nette prédominance, en Turquie (Sayin ipek, 2017), Belgique (Geurden *et al.*, 2008), Canada (Budo-Amoako *et*

III. *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie

al., 2011), Inde (Khursheed *et al.*, 2018), Brésil (Fiuza *et al.*, 2011 ; Paz e Silva *et al.*, 2014), Espagne (Quilez *et al.*, 2008 ; Diaz *et al.*, 2018), cératines régions de la Grèce (Papanikolopoulou *et al.*, 2018) et de la chine (Wu *et al.*, 2018).

A l'issu de cette partie du travail nous avons pu mettre en évidence les génotypes / Assemblages des deux parasites de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les petits ruminants dans la steppe centrale d'Algérie mais cela dans seulement quelques sites à l'échelle de la région d'étude, il en ressort que l'Assemblage E de *G. intestinalis* et *C. xiaoi* , sont les seuls présents dans ces endroits . Il serait intéressant de reconduire ce type d'étude sur un plus grand nombre d'animaux et dans diverses régions de la steppe afin de révéler la présence d'éventuels d'autres espèces ou de confirmer la présence exclusive des espèces retrouvées. Cette étude ne peut pas confirmer le rôle associées aux petits ruminants dans la transsmission zoonotique de *Giardia* et *Cryptosporidium* aux humains dans la steppe centrale d'Algérie.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

En Algérie les études conduites à la recherche des protozoaires intestinaux, *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevage ont été réalisées pour la plupart dans les régions nord du pays qui renferment un effectif animal réduit en le comparant à la steppe qui est une région à l'origine une région à vocation pastorale.

Dans ces milieux les humains sont en contact étroit à leurs bêtes donc il serait plus intéressant d'y étudier le risque de transmission zoonotique notamment dans le cas des infestations fréquentes avérés. Dans cette optique le présent travail a été entrepris sur un échantillon des animaux d'élevage aléatoirement choisi dans la steppe centrale d'Algérie pour l'estimation de la prévalence de ces deux parasites, l'études des certaines facteurs de risque qui leur sont associés et l'évaluation de leur potentiel zoonotique probable dans ces milieux qui semble plus à risque.

Au terme de ce travail et après dépouillement des résultats, on peut confirmer la présence des parasites protozoaires intestinaux, *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les animaux d'élevages, ovin, caprin et bovin, dans la steppe centrale d'Algérie à l'instar de différentes autres régions dans le pays. Toutefois la prévalence de ces deux pathogènes semble inférieure dans ces milieux steppiques comparativement à la plupart des études conduites à l'échelle nationale et international.

Parmi les facteurs de risque étudiés, l'âge a le plus d'impact comme avait été toujours démontré dans la littérature. Les infestations à *Cryptosporidium* sont beaucoup plus fréquent chez les animaux ayant un âge compris entre 5 et/ou 9 jours jusqu'à 21 jours pour les petits ruminants et entre 8 et 30 jours pour le bovin alors que les infestations à *Giardia* sont plus tardives, elles sont plus fréquentes chez les jeunes bovins de 1 à 2 mois, les ovins de 21 à 30 jours et durant toute la vie d'un caprin au niveau de la steppe centrale d'Algérie. Donc le modèle de la cinétique de *Giardia* diffère selon que l'hôte soit du bovin ou un petit ruminant.

Quant au type d'élevage, il se montre favorisant à l'infestation à *Cryptosporidium* mais pas à celle à *Giardia*. Par contre le type de l'espèce d'élevage a toute son importance dans les deux cas qu'elle soit pour *Giardia* ou *Cryptosporidium*, le bovin dans la steppe algérienne semble plus réceptifs à *Cryptosporidium* comme le bovin dans nombreuses autres régions dans le monde mais moins réceptifs à *Giardia* en le comparant aux petits ruminants dont l'infestations à *Giardia* y été plus fréquente, probablement cette étude est parmi les rares qui ont étudié cette effet dans le monde.

Conclusion et perspectives

L'effet de la région d'étude sur l'infestation par *Giardia* et *Cryptosporidium* n'est pas moindre, il s'est montré que dans les régions de Djelfa et d'El-Bayadh, les infestations seront plus fréquentes et cela fait ressortir un facteur sous jacent qui est le facteur climat, c'est un facteur limitant qui détermine l'aire de répartition de ces parasites dans la steppe algérienne, donc dans les futures travaux sur ces deux parasites il est nécessaire de les rechercher dans les microclimats plus humides où ils sont donc le plus présents.

Les diarrhées dans la présente étude se sont avérées beaucoup plus liées à *Cryptosporidium* qu'à *Giardia*, seul l'ovin à El-Bayadh et le caprin à Djelfa qui font l'exception, ils sont plus susceptibles même lorsque *Giardia* est en cause de l'affection. Et paradoxalement le caprin semble insensible à *Cryptosporidium* à Djelfa et à Laghouat à cause probablement des espèces et/ou génotypes en cause qui peuvent être pathogènes pour certaines et inoffensifs pour d'autres.

L'analyse génétiques de certains des isolats obtenus de l'analyse microscopique, a révéler l'existence de l'Assemblage E pour *G. intestinalis* et *C. xiaoi* chez seulement les petits ruminants, mais le nombre réduit des spécimens soumis à l'analyse ne pourra pas déterminer réellement l'identité génétique des deux espèces de parasites chez les animaux d'élevage dans la steppe centrale d'Algérie, donc il est difficile de comprendre et interpréter certains résultats de l'étude par approches classiques et la possibilité qu'ils soient douées d'un potentiel zoonotique.

L'un des facteurs à l'origine de l'échec de l'amplification de l'ADN dans nos échantillons et l'effet inhibiteur du conservateur utilisé qui est le dichromate de potassium au cours des longues périodes de conservation.

Cet étude est une première dans l'exploration de l'effet de ces deux parasites chez l'animal dans la steppe centrale en Algérie mais elle ne devra pas être la dernière dans la région vu l'immense effectif animal et l'importance de l'activité d'élevage pour la population de cette région.

Comme perspectives, des études beaucoup plus approfondies doivent être reconduite avec la prise en compte d'un certains nombre de considérations techniques et de conception là où on recommande de prendre en considération le climat de la région d'étude, l'âge et le statut clinique des animaux soumis à l'étude qui doivent être indispensablement des jeunes diarrhéiques que l'on recherche le plus dans les endroits

Conclusion et perspectives

frais. Dans les futurs travaux la conservation des échantillons pour l'étude moléculaire doit être brève et adéquate selon le parasite en question, pour une meilleure évaluation du potentiel zoonotique associées à ces animaux dans les régions steppiques.

Il est également nécessaire d'entreprendre des enquêtes épidémiologiques pour déterminer l'origine de la contamination humaine et la part qui revient aux animaux d'élevage dans ce contexte. Il est très probable que dans cet environnement la fréquence de transmission directe ne soit pas négligeable en raison de la culture et les attitudes avec les animaux d'élevage.

Pour l'étude de l'épidémiologie des deux parasites chez les animaux d'élevages, elle reste encore insuffisante notamment celle relatif à *Giardia*, d'autres facteurs de risque (litière, hygiène, contact à la mère, alimentation.....etc.) doivent être explorés pour permettre l'instauration des mesures de prévention nécessaires à l'éradication de ces deux pathogènes dans les élevages animaux en Algérie.

Toutefois, on peut conclure, bien qu'il soit préliminaire, que le potentiel zoonotique supposé des deux, *Cryptosporidium* et *Giardia*, chez les animaux d'élevage est nulle dans la steppe centrale en Algérie au moins pour les petits ruminant. Et que les facteurs de risque qui entretiennent ces infestations dans les élevages animaux dans cet environnement sont essentiellement l'âge, le climat et d'un degré moindre le type d'élevage intensif pour *Cryptosporidium*. Il est également nécessaire de signaler l'effet pathogène qu'exercent ces parasites dans les élevages animaux notamment dans le cas de *Giardia* qui semblait négligé!