**Thèse de Doctorat en Sciences Vétérinaire de Mme SAHRAOUI Lynda**

**Caractérisation phénotypique et génotypique de cryptosporidium chez les ruminants et stratégies thérapeutiques**

**Alger, École Nationale Supérieure Vétérinaire : 2020**

**Résumé :**

Cryptosporidium est un parasite protiste intracellulaire mais extra-cytoplasmique obligatoire qui infecte un large éventail d'hôtes vertébrés et cause une maladie intestinale importante chez les animaux et chez l'homme. Le but de cette étude était de détecter et de caractériser Cryptosporidium spp. dans des échantillons fécaux de veaux et d’agneaux naturellement infectés en Algérie. Un total de 65 et 83 échantillons fécaux de veaux et d’agneaux (âgés de moins de 3 mois) a été recueilli dans 12 et 14 fermes d'élevages de vaches laitières et de bergeries respectivement, dans quatre régions répartis sur huit wilayas. La présence de Cryptosporidium a été établie par une méthode d’immunofluorescence (IF). Des échantillons positifs ont ensuite été analysés par PCR-ARNr 18S et PCR-RFLP afin de déterminer les espèces présentes. Les échantillons positifs pour Cryptosporidiumparvum ont été sous-typés via un séquençage des produits d’amplification du gène gp60. L’étude microscopique à l’immunofluorescence a révélé la présence d’oocystes de Cryptosporidium dans 40/65 (62%) et 36/83 (43%) respectivement chez les veaux et les agneaux. Les résultats de l’analyse PCR-gp60 a montréla présence de C. parvum, C. bovis et C. ubiquitum. L’étape du sous-typage des isolats de C. parvum a révélé deux familles du génotype, IIa et IId. Quatre sous-types ont été reconnus dans la famille IIa (IIaA15G2R1, IIaA13G2R1, IIaA16G2R1 et IIaA21G2R1). Un sous-type majoritaire a été reconnu dans la famille IId, le sous-type IIdA16G1. Ces résultats illustrent la forte présence de Cryptosporidium chez les ruminants et augmentent la diversité des isolats de C. parvum avec la première description des sous-types IIaA15G2R1 et IIdA16G1 en Algérie. La présence de familles de sous-types zoonotiques de C. parvum (IIa, IId) dans cette étude suggère que les ruminants constituent probablement un important réservoir de C. parvum zoonotique. Il n'existe actuellement aucun traitement disponible totalement efficace contre la cryptosporidiose chez l'homme ou chez l'animal. Par conséquent, il existe un besoin critique pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Afin de montrer l'activité "anticryptosporidienne" de deux polysaccharides naturels : chitosans ainsi que de la Paromomycine, nous avons étudié les effets de ces molécules sur C. parvum d’isolats bovin et ovin dans deux modèles in vitro (lignées HCT-8 et Caco-2) et in vivo (souris CD-1 nouveau-nés). Les tapis cellulaires ainsi que les souriceaux ont été inoculés avec des oocystes de C. parvum (isolats naturels), traités avec les molécules à tester et comparés à des témoins. La paromomycine, un médicament classique utilisé en médecine vétérinaire, a été utilisée comme composé de référence. Un test d’infectiosité des isolats a été effectué avant l’évaluation de ces molécules. Nos résultats ont montré l’apparition considérable de formes intracellulaires des parasites et des réductions significatives de ces formes intracellulaires des oocystes de Cryptosporidium. En outre, la paromomycine, et les chitosans inhibent de manière significative la multiplication du parasite dans les cellules HCT-8 et Caco-2 (P <0,05). Dans les études in vivo, le traitement avec chitosans ou du sulfate de paromomycine a considérablement réduit l'excrétion parasitaire chez les souris nouveau-nées infectées. En conclusion, ces résultats constituent la première preuve in vitro et in vivo des activités anti-cryptosporidiennes de ces polysaccharides naturels sur des isolats de terrain de Cryptosporidium

**Abstract:**

Cryptosporidium is an obligate intracellularbat extra-cytoplasmic parasite that infects a wide range of vertebrate hosts and causes significant intestinal disease in animals and humans. The aim of this study was to detect and characterize Cryptosporidiumspp. in faecal samples from naturally infected calves and lambs in Algeria. A total of 65 and 83 faecal samples from calves and lambs (less than 3 months old) were collected from 12 and 14 dairy cow and sheepfold farms respectively, in four regions across eight wilayas. The presence of Cryptosporidium has been established by an immunofluorescence method (IF). Positive samples were then analyzed by PCR-18S rRNA and PCR-RFLP to determine the species present. The positive samples for Cryptosporidium parvum were subtyped via sequencing of the amplification products of the gp60 gene. The immunofluorescence microscopic study revealed the presence of Cryptosporidium oocysts in 40/65 (62%) and 36/83 (43%) in calves and lambs, respectively. The results of the PCR-gp60 analysis showed the presence of C. parvum, C. bovis and C. ubiquitum. The subtyping step for C. parvum isolates revealed two families of the genotype, IIa and IId. Four subtypes have been recognized in the IIa family (IIaA15G2R1, IIaA13G2R1, IIaA16G2R1 and IIaA21G2R1). A majority subtype has been recognized in the IId family, the IIdA16G1 subtype. These results illustrate the strong presence of Cryptosporidium in ruminants and increase the diversity of isolates of C. parvum with the first description of the subtypes IIaA15G2R1 and IIdA16G1 in Algeria. The presence of families of zoonotic subtypes of C. parvum (IIa, IId) in this study suggests that ruminants probably constitute an important reservoir of zoonotic C. parvum. There is currently no treatment available that is completely effective against Cryptosporidiosis in humans or animals. Therefore, there is a critical need for the development of new therapeutic agents. To study the "anti-cryptosporidian" activity of two chitosans; Chitosan NAG, chitosan Mix and Paromomycin. We studied the effects of these molecules on C. parvum of bovine and ovine isolates in two in vitro models (HCT-8 and Caco-2 lines) and in vivo, newborn CD-1 mice were inoculated by the oral with C. parvum oocysts (natural isolates), treated with the test molecules and compared with untreated infected animals. Paromomycin, a classic drug used in veterinary medicine, was used as the reference compound. An infectivity test of the isolates was carried out before the evaluation of these molecules. Our results showed the considerable appearance of intracellular forms of parasites and significant reductions of these intracellular forms of Cryptosporidium oocysts. In addition, paromomycin, chitosan mix and chitosan NAG significantly inhibit the multiplication of the parasite in HCT-8 and Caco-2 cells (P <0.05). In in vivo studies, treatment with (Chitosans) or paromomycin sulfate significantly reduced parasitic shedding in treated infected newborn mice. In conclusion, these results constitute the first in vitro and in vivo evidence of the anticryptosporidial activities of these natural polysaccharides on Cryptosporidium field isolates