

ETUDE DES FACTEURS DE RISQUE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE CHEZ LES JEUNES VEAUX EN ELEVAGES BRETONS

THESE
pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

TOUKMIDINE Kenza
Née le 15/12/1995 à BEAUVAIS (60)

Directeur de thèse : M. Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Gilles MEYER
M. Philippe JACQUIET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

Remerciements

A Monsieur le Professeur VALENTIN Alexis

Professeur en Zoologie et parasitologie

Université Paul Sabatier

Qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

A Monsieur le Professeur MEYER Gilles

Professeur en Pathologie des ruminants

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour être à l'origine de ce travail, et pour son accompagnement jusqu'en Bretagne.

Très sincères remerciements.

Monsieur le Professeur JACQUIET Philippe

Professeur en Parasitologie et Maladies Parasitaires

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui a accepté de participer à ce jury de thèse en tant que second assesseur.

Sincère remerciements.

A l'équipe du GDS Bretagne

Et plus particulièrement à DENISOT Virginie

Pour son accompagnement pendant ses quatre petits mois en Bretagne.

Très sincères remerciements

A l'équipe de HealthyCalf

Sans qui ce sujet n'aurait pu voir le jour.

Sincères remerciements.

A l'équipe du CHU de Rouen

Pour me prêter vos données

Sincères remerciements.

Aux éleveurs de Bretagne

Pour leur accueil chaleureux.

Très sincères remerciements.

Etude des facteurs de risque de la Cryptosporidiose chez les jeunes veaux en élevages Bretons

Table des matières

Introduction.....	16
Partie I : Les entérites néonatales du veau.....	17
A. Définition et importance.....	17
B. Les agents infectieux.....	19
a. Présentation des agents infectieux.....	19
i. Les virus	19
1. Virus responsables de diarrhée néonatale	20
2. Virus susceptibles d'être responsable de diarrhée néonatale	22
ii. Les bactéries	25
1. Salmonella spp	25
2. Escherichia coli	27
3. Clostridium perfringens.....	28
iii. Les parasites	29
1. Cryptosporidiose	29
2. Giardiose	30
3. Coccidiose	30
b. Les co-infections.....	30
C. Les diarrhées d'origine alimentaire.....	32
D. Les facteurs de risques des diarrhées néonatales	32
a. Transmission de l'immunité passive	33
i. Le colostrum.....	33
1. Statut des mères.....	33
2. Qualité et quantité de colostrum ingéré.....	34
b. Bâtiment et environnement.....	35
i. Lieu et saison de vêlage.....	35

ii.	Logement des veaux	36
iii.	Ventilation	37
iv.	Gestion de la litière et nettoyage des locaux	37
v.	Nettoyage du matériel d'alimentation	38
c.	Alimentation	38
i.	Alimentation des vaches en fin de gestation	38
ii.	Alimentation des veaux en phase d'allaitement	38
d.	Gestion du troupeau.....	39
i.	Gestion des mouvements d'animaux au sein du troupeau.....	39
ii.	Maitrise du parasitisme.....	40
e.	Autres facteurs de risques.....	40

Partie II : *Cryptosporidium* et sa maladie : la cryptosporidiose ..42

A. Taxonomie et nomenclature42

B. Cycle de *cryptosporidium* spp.46

a.	Morphologie des différents stades parasitaires.....	46
i.	Les oocystes à paroi épaisses.....	46
ii.	Les sporozoïtes	47
iii.	La membrane parasitophore	48
iv.	Les trophozoïtes.....	49
v.	Les mérontes et les mérozoïtes type I et II	50
vi.	Les gamontes	51
1.	Les microgamontes	51
2.	Les macrogamontes.....	51

C. La maladie : la cryptosporidiose chez les ruminants52

a.	Clinique du veau nouveau-né	52
b.	Epidémiologie.....	53
i.	La place de <i>Cryptosporidium</i> spp dans le monde.....	53

ii.	La place de <i>Cryptosporidium</i> spp en France	60
iii.	Transmission et risque zoonotique	63
1.	La transmission du parasite	63
2.	Les risques zoonotiques	65
c.	Diagnostic : les techniques de détection et d'identification	69
i.	Les techniques de détection.....	69
1.	Détection par microscopie.....	69
2.	Détection par techniques d'immunologie	70
ii.	Les techniques d'identification moléculaire.....	72
1.	Extraction de l'ADN	72
2.	Réactions d'amplifications en Chaîne par Polymérase (PCR).....	72
3.	Sous-typage de <i>C. parvum</i>	74
d.	Facteurs de risques de la cryptosporidiose bovine	75
e.	Contrôle et prévention	80
i.	La résistance de <i>Cryptosporidium</i>	80
ii.	Traitement.....	81
1.	Le lactate d'halofuginone.....	81
2.	La paromomycine.....	83
3.	Des molécules alternatives en recherche.....	83
4.	L'ajout de levures à l'alimentation.....	84
iii.	Prévention.....	85
1.	Prophylaxie hygiénique.....	85
2.	Vaccination des mères.....	86
3.	Vaccination des veaux.....	87

Partie III. Etude expérimentale sur les facteurs de risques de la cryptosporidiose du jeune veau en Bretagne89

A. Introduction.....89

B. Matériels et méthodes	90
a. Choix des élevages	90
b. Choix des animaux	91
c. Prélèvements des échantillons	91
i. Première et deuxième campagnes :	91
ii. Troisième campagne de prélèvements :.....	92
1. Protocole suivi de novembre 2020 au 10 décembre 2020 :.....	92
2. Protocole suivi du 10 décembre 2020 à février 2021 :.....	93
d. Analyses des prélèvements	93
i. Sur le terrain : Kit Speed V-Diar 5 TM	93
ii. En laboratoire : PCR nichée	94
1. Séquençage par PCR 18S :.....	95
2. Génotypage.....	95
e. Questionnaire.....	96
f. Mise en forme des données	97
g. Analyse statistique.....	97
C. Résultats	98
a. Résultats de la recherche de <i>cryptosporidium</i> par test immunologiques dans les fèces	98
b. Résultats de la recherche de <i>cryptosporidium</i> par PCR dans les fèces	99
c. Résultats de l'analyse statistique des facteurs de risque.....	102
i. Nature des facteurs de risques recherchés	102
ii. Facteur traitement prophylaxie.....	104
iii. Facteur administration du colostrum	105
iv. Facteur abreuvement.....	105
D. Discussion	107
Conclusion.....	110

Bibliographie.....111

Annexes122

Annexe 1 : Tract personnalisé pour présenter le projet HealthyCalf aux éleveurs en 2018 (Chapuy, 2019).....122

Annexe 2 : Fiche détaillé du projet HealthyCalf pour les vétérinaires (Chapuy 2019)123

Annexe 3 : Fiche de suivi clinique utilisé par les éleveurs pendant les deux premières campagnes.....124

Annexe 4 : Fiche excel de suivi clinique des veaux pour la campagne 2020-2021.....125

Annexe 5 : Questionnaire sur les facteurs de risque126

Annexe 6 : Aperçu du fichier excel rassemblant les données des questionnaires et des résultats de recherche de *cryptosporidium* par PCR.....128

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique du cycle de vie de <i>Cryptosporidium parvum</i>	45
Figure 2 : Image en microscopie électronique à balayage d'un oocyste intact (Borowski et al., 2010).....	47
Figure 3 : Image en microscopie électronique à balayage d'une trace de glissement composée de microvillosités allongées entre un oocyste désenkysté et des trophozoïtes 3 jours après l'inoculation (Borowski et al., 2010)	48
Figure 4 : Image en microscopie électronique à balayage d'un désenkystement d'oocyste 48h post inoculation (Borowski et al., 2010)	48
Figure 5 : Image en microscopie électronique à balayage de sporozoïtes de <i>Cryptosporidium muris</i> avec formation de la membrane parasitophore (flèche) (Valigurova et al., 2008)	49
Figure 6 : Image en microscopie électronique à balayage d'un trophozoïte en cours de maturation, complètement entouré par la membrane parasitophore, avec visualisation de structures similaire à des pores (flèche) (Valigurova et al., 2008).....	50
Figure 7 : Méronite de type I (Valigurová et al., 2008)	51
Figure 8 : Carte de la prévalence globale de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans différentes régions géographiques du monde définies par observation microscopique chez les animaux de rente (bovins comprenant les buffles, ovins, caprins, porcins, équins) (Hatam-Nahavandi et al., 2019)	55
Figure 9 : Représentation graphique des principaux modes de transmission des <i>Cryptosporidium</i> spp zoonotiques entre les différentes espèces impliquées et dans l'environnement (Innes et al., 2020)	64
Figure 10 : carte de la Bretagne obtenue sur le site de l'académie de Rennes	90
Figure 11 : Notice d'utilisation du test Speed V Diar 5 TM (Virbac 2019)	94
Figure 12 : Graphique représentant le nombre de tests positifs pour chaque agent pathogène recherché par le kit Speed V Diar 5 TM	98
Figure 13 : Graphique représentant les différents profils d'infections et co-infections identifiés par le kit Speed V Diar 5 TM	99

Table des Tables

Table 1 : Résultats de la recherche et identification de <i>Cryptosporidium</i> par PCR au sein des prélèvements de fèces des 3 campagnes de prélèvements (2018 à 2021).....	100
Table 2 : Résultats de la première campagne de prélèvements (2018-2019).....	101
Table 3: Résultats de la deuxième campagne de prélèvements (2019-2020).....	101
Table 4 : Résultats de la troisième campagne de prélèvements (2020-2021)	102
Table 5 : Résultats de l'analyse mutivariée du facteur traitement prophylactique sur le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose par PCR	104
Table 6 : Résultats de l'analyse multivariée du facteur administration du colostrum sur le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose par PCR	105
Table 7 : Résultats de l'analyse multivariée du facteur abreuvements sur le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose par PCR.....	106

Liste des abréviations

18S rRNA	ARN ribosomique 18S
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEEC	<i>E. coli</i> attachement-effacement
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BNebV	Nebovirus bovin
BNoV	Norovirus bovin
BToV	Torovirus bovin
BVD	Bovine Viral Diarrhea ou Diarrhée Virale Bovine
BVDV	Virus du BVD
<i>C. andersoni</i>	<i>Cryptosporidium andersoni</i>
<i>C. bovis</i>	<i>Cryptosporidium bovis</i>
<i>C. hominis</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i>
<i>C. meleagridis</i>	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>C. parvum anthroponosum</i>	<i>Cryptosporidium parvum anthroponosum</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. ryanae</i>	<i>Cryptosporidium ryanae</i>
<i>C. suis</i>	<i>Cryptosporidium suis</i>
CDPK1	Protéine kinase 1 dépendante du calcium
CNR Cryptosporidiose	Centre National de référence sur les <i>Cryptosporidium</i>
Cowp	<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DN	Diarrhée néonatale
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroaggrégatives
EDE	Etablissement départementale d'élevage
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragiques
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasives
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogènes
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes

FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
GDS	Groupements de Défense Sanitaire
gp60	Glycoprotéine de 60kDA
GTV	Groupements Technique Vétérinaire
hsp70	Protéine de choc thermique de 70kDA
ICZN	Code International de Nomenclature Zoologique
Ig	Immunoglobulines
INRA-GABI	Institut national de la recherche agronomique - Génétique animale et biologie intégrative
INRA-ISP	Institut national de la recherche agronomique - Infectiologie et Santé Publique
INRA-VIM	Institut national de la recherche agronomique - Virologie et Immunologie Moléculaires
ITS	Internal Transcribed Spacers
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLT	Multilocus Typing
NSP4	Glycoprotéine non structurale 4
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paire de bases
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PD	Pharmacodynamie
PFSC	Produit de la fermentation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PK	Pharmacocinétique
RCP	Résumé des caractéristiques du produit
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
<i>S. dublin</i>	<i>Salmonella dublin</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SIDA	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
SPI	Ilot de pathogénicité de <i>Salmonella</i>
SSU	Small subunit

SSU-rRNA	Small subunit ribosomal ribonucleic acid
STEC	<i>E. coli</i> productrice de shigatoxines
T3SS	Système de sécrétion de protéines de type III
trap	Protéine adhésive « thrombospondin-related »
UE du Pin	Unité Expérimentale du Pin
UMR INRA-ENVT	Unité Mixte de Recherche INRA-Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 1225
USD	US dollar ou dollar américain
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP1	Viral protéine 1

Introduction

La cryptosporidiose est une maladie parasitaire affectant tous les animaux terrestres et la plupart des animaux aquatiques. Elle est causée par le genre *Cryptosporidium*. Ces parasites appartenant aux protozoaires se retrouvent sur tous les continents sauf l'Antarctique. Ils peuvent entraîner un syndrome gastro-intestinal plus ou moins important selon le statut immunitaire de l'hôte, les jeunes et les individus immunodéprimés étant plus sensibles. Les signes cliniques généralement observés sont de la diarrhée associée à de la déshydratation pouvant aller jusqu'à une atteinte de l'état général voire la mort de l'hôte. Plusieurs espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées depuis sa première découverte. Il existe des sous-génotypes zoonotiques et des sous-génotypes spécifiques aux humains ou aux bovins au sein de certaines espèces de *cryptosporidium*. Même si les adultes peuvent excréter ces parasites, ceux sont les veaux nouveau-nés (en général de moins d'un mois) qui présentent des signes cliniques et des plus forts taux d'excrétions. En effet les veaux malades excrètent un nombre important d'oocystes (forme de résistance) de *Cryptosporidium* dans leurs fèces, participant ainsi à la dissémination du parasite au sein de l'élevage. Une fois la phase aiguë de la maladie passée, les veaux atteints de cryptosporidiose peuvent souffrir de retard de croissance important, entraînant une perte économique pour l'éleveur sur le long terme. De nombreux désinfectants sont inefficaces contre les oocystes de *Cryptosporidium*, rendant la lutte des éleveurs contre la cryptosporidiose plus difficile. Peu de traitements sont disponibles et leur efficacité est discutée, ce qui complique encore plus la tâche des éleveurs. Ainsi la lutte contre ce parasite passe majoritairement par une prophylaxie sanitaire.

Il serait ainsi avantageux de mieux contrôler la prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* chez les bovins afin de réduire les risques pour la santé des veaux, pour la santé humaine et pour limiter les pertes économiques dans les industries affectées. Mais pour y parvenir, il est impératif d'identifier les facteurs de risque impliqués.

Malgré la nature apparemment omniprésente de la cryptosporidiose, peu de recherches ont été faites depuis sa découverte ce qui a incité l'OMS, en 2004, à l'inscrire sur la liste des "maladies négligées" au niveau mondial (Innes et al. 2020). Depuis quelques décennies les recherches sur ce parasite ont nettement augmentées mais ne sont pas encore suffisantes. En effet l'importance des facteurs de risque et des facteurs protecteurs de la cryptosporidiose varient grandement d'une étude à l'autre. Cela peut s'expliquer par des approches différentes en matière de collecte de données et d'analyses statistiques, ainsi que par la diversité de gestion

des élevages (taille de troupeau, races, vaccination...). De ce fait, peu de consensus ont pu être établis à ce jour sur les facteurs de risques de la cryptosporidiose chez le veau.

Ce travail s'intéresse dans un premier temps aux différents agents pathogènes pouvant être responsables d'entérites néonatales chez les jeunes veaux (virus, bactérie, parasite), aux diarrhées d'origine nutritionnelle ainsi qu'aux facteurs de risques de ces entérites. Dans un deuxième temps, nous présenterons plus spécifiquement les *Cryptosporidium* et la cryptosporidiose chez les bovins. La troisième partie de cette thèse est consacrée à l'étude expérimentale des facteurs de risque de la cryptosporidiose chez les jeunes veaux nés dans des élevages bretons entre octobre 2018 et février 2021.

PARTIE I : Les entérites néonatales du veau

A. Définition et importance

Les entérites néonatales se définissent comme des inflammations de la muqueuse intestinale du veau de la naissance à 4 semaines. Elles se caractérisent principalement et cliniquement par de la diarrhée (émission trop fréquente de fèces trop liquides et en volume augmenté) due à une hypersécrétion par les cellules de la muqueuse intestinale et/ou une diminution de l'efficacité de l'intestin à absorber les liquides et les nutriments. On parle ainsi fréquemment de « diarrhées néonatales du veau » (DN), la diarrhée étant le signe clinique le plus facilement identifié. Cette diarrhée entraîne un choc hypovolémique plus ou moins sévère avec déshydratation, perte de poids, affaiblissement et à plus long terme un retard de croissance du veau.

Malgré les disparités d'apparition selon les élevages, leur grande fréquence et les pertes économiques qu'elles engendrent font de la DN la première cause de morbidité et de mortalité chez le veau nouveau-né, aussi bien dans les élevages bovins laitiers que dans les élevages bovins allaitants. Ainsi dans les élevages laitiers entre 19 et 23% des veaux nouveau-nés présenteront une DN. Ces DN sont à l'origine d'un retard de croissance des veaux, d'un temps de travail allongé, de coûts augmentés (traitement et prophylaxie). Tout cela fait que le syndrome de DN impact fortement économiquement comme psychologiquement les éleveurs (Francoz, Nichols, Schelcher 2017). En termes de coût une mortalité chez les veaux de 20% à la suite de diarrhées néonatales peut entraîner une chute d'environ 38% du bénéfice net d'un élevage (Tewari 2012). La DN toucherait entre 10 et 80% des veaux selon les élevages (Ravary, Sattler, Roch 2006). Par ailleurs, la mortalité du jeune veau dans les élevages laitiers français est de 13% en moyenne et la DN représenterait 20% de ce pourcentage (Trou et al. 2016).

Les DN sont généralement d'origine multifactorielle, incluant des agents infectieux (virus, bactéries, ou parasites) et de nombreux facteurs de risques liés à :

- Un défaut de transfert de l'immunité passive via le colostrum ;
- Un contexte environnementale délétère ;
- Une alimentation non adaptée de la mère et/ou du veau ;
- Une mauvaise gestion du troupeau.

Ces facteurs influencent les modalités d'apparition de la DN selon les élevages, entraînant de grandes disparités d'évolution. La DN peut ainsi évoluer sous forme de cas sporadique, sous forme d'épizootie (atteinte d'un nombre importants de veaux en même temps,

sur une période assez courte, ne se répétant généralement pas l'année suivante), ou sous forme de bouffée épizootique (veaux malades sur une courte période, généralement d'âge similaire, se répétant d'une année sur l'autre avec plus ou moins les mêmes conditions) (Francoz, Nichols, Schelcher 2017). Les veaux peuvent être atteints dès 2 jours d'âge et ce jusqu'à plus de 30 jours de vie, avec une atteinte moyenne à 10 jours de vie. La disparité de cas entre les élevages est également influencée par la densité animale. En effet la transmission entre veaux augmente avec la densité des veaux au sein d'un même bâtiment (Tewari 2012). Ainsi en France, dans les élevages laitiers les DN sont présentes toute l'année car les veaux sont majoritairement confinés dans un bâtiment. Alors que dans les élevages allaitants, l'incidence des DN chute suite à la mise à l'herbe des animaux (Francoz, Nichols, Schelcher 2017).

B. Les agents infectieux

De nombreux agents pathogènes peuvent être à l'origine des DN, tels que des virus, des bactéries ou des parasites, chacun ayant une incidence différente selon l'âge du veau atteint (Bradford P. Smith, Pusterla 2019). Une origine nutritionnelle est également reconnue comme cause de DN chez les veaux. Dans tous les cas, les DN des veaux sont d'origine multifactorielle, de nombreux facteurs de risque intervenant.

Lors de l'identification d'un agent pathogène chez un veau malade, il n'est pas systématiquement responsable de la DN. En effet, certains agents sont connus pour avoir un pouvoir pathogène : Rotavirus, Coronavirus, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* entérotoxigène et *Cryptosporidium*. Mais d'autres agents, tels que les torovirus, et les *Giardia*, ne joueraient pas un rôle clairement défini dans la symptomatologie des DN (Institut de l'élevage 2008).

a. Présentation des agents infectieux

i. Les virus

Les virus infectant les cellules animales représentent une faible proportion du virome intestinal en comparaison des bactériophages, mais les virus font partie des étiologies les plus importantes des diarrhées néonatales chez le veau. Ils peuvent être identifiés dans les fèces des veaux sans pour autant être à l'origine des signes cliniques (Gomez, Weese 2017).

La plupart des virus pathogènes agissent en se multipliant dans les entérocytes et provoquent la destruction et l'atrophie des cellules des villosités intestinales (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

1. Virus responsables de diarrhée néonatale

1.1. Les Rotavirus

Les rotavirus sont généralement reconnus comme étant la cause la plus commune de DN chez le veau (Bradford P. Smith, Pusterla 2019). Ils appartiennent à la famille des Réovirus, et se présentent sous la forme de virions non enveloppés avec une double capsid, possédant 11 segments d'ARN bicaténaire. Ils sont divisés en sept sérogroupes, de A à G, définis selon les ressemblances génétiques et antigéniques de la protéine virale (VP) 6. Ceux du groupe A causent la majeure partie des infections à rotavirus chez les animaux domestiques, dont les bovins. Les sérogroupes B et C ont aussi été retrouvés sur le terrain (Cho, Yoon 2014). Cependant le groupe B se retrouve plus généralement chez les agneaux et le groupe C chez les bovins adultes (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

La prévalence du rotavirus chez les veaux souffrant de DN est d'environ 40 % (Institut de l'élevage 2008). La transmission se fait par voie oro-fécale, car les veaux malades excrètent le virus dans leurs fèces. Ce sont des virus résistants, pouvant survivre plus de 2 semaines dans de l'eau tiède et plusieurs mois dans de l'eau ou de la terre avec des températures inférieures à 5°C. Les matières fécales sont aussi un environnement favorable pour sa survie, puisque le virus peut y survivre jusqu'à 9 mois. Ces virus persistent ainsi longtemps dans l'environnement et augmentent le risque de réinfection à chaque nouvelle saison de vêlage (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

L'alimentation lactée des veaux peut également être un environnement favorable aux rotavirus, du fait de sa capacité à survivre à une grande fourchette de pH (Cho, Yoon 2014). La phase d'incubation est de 12 à 24h et induit une diarrhée suraiguë chez les veaux infectés (généralement âgés de 1 à 2 semaines). Une fois le veau infecté, il sécrète une quantité importante de virus via ses fèces pendant 5 à 7 jours, et ce même après arrêt des symptômes, ce qui entraîne la contamination de l'environnement et contribue à la transmission entre veaux (Cho, Yoon 2014). Les rotavirus bovins peuvent également dans de rares cas être directement transmis à l'Homme. Il existe ainsi un risque zoonotique pour l'éleveur (Doan et al. 2013).

La réplication du virus a lieu dans le cytoplasme des cellules endothéliales des villosités de l'intestin grêle. La glycoprotéine non structurale 4 (NSP4) joue un rôle important comme entérotoxine virale. Elle permet l'élévation de l'influx d'ion calcium dans le cytoplasme de la cellule cible et modifie ainsi l'homéostasie. Les flux d'eau et de nutriments dans les cellules épithéliales de l'intestin sont ainsi modifiés. Il y a une activation du système nerveux entérique

associé à une destruction des entérocytes matures de la villosité intestinale, ce qui résulte en un syndrome de malassimilation/malabsorption. L'infection virale occasionne également l'atrophie des villosités intestinales, majoritairement en partie caudale de l'intestin grêle (Cho, Yoon 2014).

La tranche d'âge des veaux atteints s'étend de quelques jours à environ 4 semaines de vie. La diarrhée peut être liquide à crémeuse, souvent mucoïde, et plus ou moins profuse. Les fèces peuvent également adopter une coloration jaunâtre. Une distension abdominale du veau peut également se manifester, due à une diminution de l'évacuation du contenu de la caillette. D'autres signes peuvent également apparaître, tels qu'une diminution de l'état de vigilance, une démarche ébrieuse, une énophtalmie plus ou moins importante, une persistance du pli de peau ou encore l'absence du réflexe de succion (Institut de l'élevage 2008).

1.2. Le Coronavirus

Le coronavirus bovin a été découvert par Mebus et al. en 1972, et il est maintenant reconnu comme une cause importante de DN des veaux, bien que moins fréquemment détecté que les rotavirus (Bradford P. Smith, Pusterla 2019). Il appartient à la famille des Coronaviridae, c'est un virus sphérique, enveloppé à ARN simple brin positif (Cho, Yoon 2014). Le virus peut également être responsable d'infections respiratoires chez les jeunes bovins, et de dysenterie hivernale (winter dysentery) des bovins adultes.

La prévalence du coronavirus chez les veaux atteints de DN est d'environ 10 % (Institut de l'élevage 2008). Le virus peut se transmettre de deux manières : par la voie orale ou bien par la voie respiratoire. On retrouve une excrétion virale dans les fèces trois jours après l'infection, et cela peut persister pendant une semaine. Une des sources de contamination les plus importantes sont les veaux nouvellement infectés qui excrètent une grande quantité de virions. L'excrétion virale diminue par la suite mais persiste plusieurs semaines, bien que le veau n'exprime plus de signes cliniques. De la même manière que le rotavirus, le coronavirus peut survivre plusieurs mois dans l'environnement (il est toutefois moins résistant) et être à l'origine de réinfection (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

Les coronavirus touchent généralement les veaux âgés de quelques jours de vie à 4 semaines. Ils entraînent de la diarrhée liquide à crémeuse, souvent contenant de fins caillots sanguins, mélangés à du mucus vitreux. On retrouve des signes cliniques similaires mais plus sévères à ceux causés par une infection au rotavirus. Néanmoins les coronavirus peuvent également donner des signes cliniques de type respiratoires (jetage, toux) associés ou non aux

symptômes digestifs. Ces atteintes respiratoires peuvent également être observés chez des veaux âgés de plus de 4 semaines de vie (Institut de l'élevage 2008).

Le virus s'installe en premier lieu au niveau de l'intestin grêle, puis tend à coloniser tout l'intestin ainsi que le côlon. Il se réplique dans les entérocytes et les virions ainsi obtenus sont libérés par lyse cellulaire de la cellule infectée. Cela entraîne une atrophie des villosités intestinales, des cryptes du colon, et une nécrose de la lamina propria. Les premières cibles du virus sont les cellules épithéliales des villosités intestinales mais les cryptes peuvent également être infectées (Cho, Yoon 2014).

2. Virus susceptibles d'être responsable de diarrhée néonatale

2.1. Les Pestivirus bovins

Les pestivirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin positif. Trois espèces du genre pestivirus peuvent entraîner des diarrhées virales bovine (BVD) : le Bovine Viral Diarrhea virus 1 (BVDV-1), le BVDV-2 et le virus HoBi-like (ou BVDV-3) (Evans et al. 2019). De nos jours, il a été défini au moins 21 sous-génotypes de BVDV-1 (1a à 1u) et 4 sous-génotypes de BVDV-2 (2a à 2d) (Yeşilbağ, Alpay, Becher 2017). Chaque virus peut être aussi classé selon leur biotype : effet cytopathique ou effet non cytopathique. Les virus à effet non cytopathique sont responsables des infections permanentes chez les bovins (Cho, Yoon 2014).

La grande diversité génétique des BVDV, reflétée par le nombre de sous-génotypes détectés, a été décrite pour plusieurs pays européens, ainsi que pour la Chine et la Turquie.

Le BVDV-1 et le BVDV-2 ont été identifiés comme étant plus dispersés géographiquement que les virus Hobi-like, le BVDV-1 et le BVDV-2 ayant été identifiés sur tous les continents abritant des troupeaux de ruminants domestiques ou sauvages. La seule exception à cette règle est l'absence apparente du BVDV-2 en Australie et en Nouvelle-Zélande (Ridpath et al. 2010).

Les analyses effectuées au cours des deux dernières décennies ont montré la présence du BVDV-2 dans un certain nombre de pays européens, dont l'Allemagne, la Belgique, la France, le Royaume-Uni, la Slovaquie et l'Autriche. Le BVDV-2a est le sous-genre le plus répandu du BVDV-2 sur tous les continents. Le BVDV-2c a été détecté uniquement en Europe et en Amérique. On note également que les sous-genres BVDV -1f, -1g, -1h, -1k, -1l, -1r, 1s et -1t n'ont été identifiés qu'en Europe. On peut supposer que cette grande variabilité génétique

pourrait être liée, au moins dans une certaine mesure, aux politiques d'importation d'animaux de ces pays (Yeşilbağ, Alpay, Becher 2017).

La période d'incubation des Pestivirus bovins, lors de l'infection, est comprise entre 6 et 12 jours post-exposition mais peut fluctuer en fonction de la souche du virus, de sa virulence et de la dose de virus transmise. Une fois infectés, les animaux excrètent de faibles quantités de virus dans les sécrétions corporelles. Les excréments se font du 3ème au 15ème jour après l'infection mais peuvent toutefois durer jusqu'à 3 semaines. Une fois que les animaux ne sont plus infectieux et que l'excrétion virale est terminée, la réponse humorale et cellulaire confère aux animaux une immunité à vie contre la souche virale infectante (Evans et al. 2019).

Les manifestations cliniques des infections transitoires par le BVD peuvent être variées et sont reconnues comme dépendant de la souche virale infectante ainsi que de l'âge, du statut immunologique et de l'état reproducteur de l'animal au moment de l'infection. Les veaux « naïfs » et les bovins adultes non gravides infectés de façon transitoire par le BVD ne présentent généralement aucun signe clinique ou seulement des signes cliniques légers tels que de la fièvre, une diminution de l'appétit et de la diarrhée (Evans et al. 2019). Ces signes cliniques et leur gravité peuvent également varier selon la présence ou non de co-infection. Pour les cas aigus, l'infection est caractérisée par une diarrhée, une hyperthermie, une dépression, de l'anorexie, des ulcères buccaux, un syndrome hémorragique et une lymphopénie / leucopénie qui peut aller jusqu'à l'immunosuppression. Les animaux immunodéprimés deviennent alors plus vulnérables face aux autres agents pathogènes (Cho, Yoon 2014).

Ainsi la diarrhée de veaux nouveau nés infectés par le BVDV peut être due à l'action directe d'une souche pathogène et/ou à l'effet immunosuppresseur favorisant les coinfections avec les autres pathogènes digestifs du veau.

2.2. Les Norovirus bovins

Les norovirus bovins, de la famille des Caliciviridae, sont des virus non enveloppés à ARN simple brin positif. Sur la base des relations phylogénétiques déduites des séquences VP1 (protéine majeure de la capsid), les norovirus ont été divisés en 6 génogroupes (GI à GVI), les norovirus bovins (BNoV) étant classés dans le GIII (Gomez, Weese, 2017). Ils se divisent en deux souches de virus distinctes : Jena (GIII-1) et Newbury (GIII-2). Ces souches sont phylogénétiquement différentes des virus humains (GI, GII et GIV), porcins (GII-11,-18,-19) et murins (GV) (Cho, Yoon 2014).

La pathogénie du BNoV est mal connue ; cependant, l'extrapolation à partir d'autres espèces, notamment l'homme, suggère que le BNoV peut être transmis par voie fécale/orale, par le biais d'aliments ou d'eau contaminés. La prévalence du BNoV chez les bovins n'a cependant pas été bien établie (Gomez, Weese 2017).

Le virus peut provoquer une gastroentérite chez les bovins (Cho, Yoon 2014). Une étude réalisée sur 6 veaux nouveau-nés, inoculés par une souche Jena, a montré que le virus avait pour cible les cellules épithéliales de l'intestin grêle et engendrait l'atrophie des villosités du jéjunum et de l'iléon. Les jeunes veaux ont présenté une diarrhée, associée à une sécrétion fécale du virus et l'absence de séroconversion (Otto et al. 2011). Cependant, ce virus a aussi été retrouvé dans les fèces de veaux sains, soulevant des questions sur l'importance clinique du BNoV (Cho, Yoon 2014).

2.3. Le Torovirus bovin

Le torovirus bovin est un virus à ARN enveloppé, à simple brin positif, (~30 kb) appartenant au genre Torovirus dans la famille des Coronaviridae, ordre des Nidovirales (Cho, Yoon 2014). Les torovirus ont été identifiés chez les humains, les chevaux, les bovins et les porcs atteints de gastro-entérite dans le monde entier, mais leur rôle dans l'étiologie de la maladie n'est toujours pas clair. Le torovirus bovin (BToV) a également été identifié dans les fèces de veaux diarrhéiques et sains, son rôle dans la maladie reste ainsi mal caractérisé (Gomez, Weese 2017).

L'infection naturelle se produit généralement chez les veaux âgés de 2 à 5 jours, mais les veaux jusqu'à 4 mois semblent être sensibles. Les veaux diarrhéiques âgés de 1 mois qui excrètent le BToV semblent être la principale source du virus (Gomez, Weese 2017). Après inoculation orale ou nasale du virus, les cellules épithéliales des parties moyennes et inférieures des villosités intestinales s'étendant jusqu'à l'épithélium de la crypte sont infectées, ce qui entraîne une mort cellulaire et une desquamation épithéliale dans l'intestin grêle, ainsi qu'une nécrose dans le gros intestin. Les dommages causés aux entérocytes villositaires et cryptiques induisent donc une diarrhée malabsorptive/maldigestive (Cho, Yoon 2014).

2.4. Le Nebovirus bovin

Semblable au norovirus, le nébovirus est un virus non enveloppé de la famille des Caliciviridae. Il existe deux génotypes distincts qui seraient impliqués dans la diarrhée des veaux : Newbury agent-1 et Nebraska-like bovine calicivirus (Cho, Yoon 2014).

Des épidémies de gastro-entérite associées au nebovirus bovin (BNebV) ont été initialement signalées chez des veaux diarrhéiques en Angleterre et en Allemagne, mais le BNebV a été détecté chez des bovins dans le monde entier. En France, au Royaume-Uni et en Corée, la prévalence du BNebV chez les veaux diarrhéiques variait de 7 à 9 % (Gomez, Weese 2017).

Comme pour les BNoV, les lésions causées par les nebovirus sont observées principalement dans le jéjunum et l'iléon avec une atrophie des villosités, une perte des villosités entérocytaires et une hyperplasie des cryptes lorsque des veaux gnotobiotiques sont exposés au virus (Cho, Yoon 2014).

ii. Les bactéries

1. *Salmonella* spp

Salmonella enterica est une bactérie qui colonise le tractus gastro-intestinal d'un large éventail d'hôtes. *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) et serovar Dublin (*S. dublin*) sont les agents étiologiques les plus courants à l'origine de la salmonellose chez les bovins (Cho, Yoon 2014), bien qu'il existe plus de 2200 sérotypes de *Salmonella* dans le monde (Bradford P. Smith, Pusterla 2019). Les veaux peuvent être infectés par un large éventail de sérotypes de salmonelles dans les heures qui suivent leur naissance. Mais *S. Typhimurium* est généralement incriminée dans les épidémies de diarrhées chez les veaux âgés de moins de 2 mois (Mohler, Izzo, House 2009).

Les veaux peuvent être infectés dès quelques heures après le vêlage (Mohler, Izzo, House 2009) si l'élevage présente une contamination endémique à *Salmonella*. Les sources de contamination possibles sont : le colostrum, le lait, le matériel, le personnel et l'environnement (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

Les veaux peuvent être asymptomatiques à la suite de l'infection tout comme ils peuvent développer des signes cliniques modérés à sévères. Le plus fréquent lors des infections à *S. typhimurium* est d'observer une diarrhée aigüe, tandis qu'une infection par *S. dublin* se manifeste plutôt par une maladie systémique (Cho, Yoon 2014). La salmonellose touche généralement les veaux entre 4 et 28 jours de vie, bien l'on puisse observer cette maladie chez des veaux plus âgés (Mohler, Izzo, House 2009).

Même si *Salmonella* peut provoquer des diarrhées aussi bien chez les bovins adultes que chez les veaux, l'infection est beaucoup plus fréquente et provoque souvent des symptômes graves chez les veaux âgés de 10 jours à 3 mois (Cho, Yoon 2014).

Le système de sécrétion de protéines de type III (T3SS) codé par l'îlot de pathogénicité 1 de *Salmonella* (SPI-1) délivre des protéines effectrices nécessaires à l'invasion intestinale et au déclenchement de l'entérite. Le T3SS est considéré comme le facteur de virulence le plus important de *Salmonella*. SPI-1 code des facteurs de transcription qui régulent l'expression de certains facteurs de virulence de *Salmonella*, tandis que d'autres facteurs de transcription codés en dehors de SPI-1 participent à l'expression des gènes codés par SPI-1. Les gènes SPI-1 sont responsables de l'invasion des cellules hôtes, de la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte, et la formation de biofilms. Le réseau de régulation de SPI-1 est très complexe et crucial (Lou et al. 2019).

On sait que SPI-1 et SPI-5 influencent le T3SS et sont principalement responsables de la diarrhée induite par *Salmonella* chez les veaux (Cho, Yoon 2014).

Les signes cliniques comprennent de la fièvre, des troubles du comportement, une perte d'appétit et des diarrhées souvent caractérisées par une augmentation du mucus, des lésions pariétales, de la fibrine et du sang (entérites fibrino-nécrotico-hémorragiques). La déshydratation, associée à des troubles acido-basiques et électrolytiques, contribue à l'affaiblissement et à la dépression des veaux gravement infectés. La gravité et la durée de la maladie clinique chez les veaux sont liées à la virulence de la souche, à la dose infectante, à l'âge du veau, à l'efficacité de l'immunité passive, à la nutrition et au degré de stress environnemental (Mohler, Izzo, House 2009).

La transmission fécale-orale est la principale voie d'infection. Cependant, d'autres voies signalées incluent la muqueuse des voies respiratoires supérieures et la conjonctive. Après l'ingestion, les salmonelles colonisent le tractus intestinal et envahissent les cellules M (qui sont des cellules spécialisées dans les tissus lymphoïdes intestinaux), les entérocytes et le tissu lymphoïde amygdalien. Dans le tissu lymphoïde, les salmonelles pénètrent dans les phagocytes mononucléaires et sont rapidement disséminées dans l'organisme. Les mécanismes fondamentaux de virulence de *Salmonella spp* comprennent la capacité d'envahir la muqueuse intestinale, de se multiplier dans les tissus lymphoïdes et d'échapper aux systèmes de défense de l'hôte, ce qui entraîne une maladie systémique. On pense que la diarrhée associée à la salmonellose est en grande partie due à la réponse inflammatoire à l'infection (Mohler, Izzo, House 2009). Ainsi, les lésions souvent retrouvées chez le veau sont une atteinte de la pseudomembrane de la muqueuse de l'intestin grêle et une adénomégalie des nœuds lymphatiques mésentériques (Cho, Yoon 2014).

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) est une entérobactérie anaérobie facultative gram négatif, faisant partie de la flore intestinale des bovins. Cependant certaines souches présentent des caractéristiques de virulence causant l'apparition de maladie gastroentérique (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

Les *E. coli* responsables d'entérites peuvent être classés en six groupes pathogènes en fonction de leur schéma de virulence :

- *E. coli* entérotoxigènes (ETEC : F5, F41, FY, CS31A) : l'infection est majoritairement situé dans l'intestin grêle, il n'y a pas d'atteintes des villosités intestinales cependant des adhésines (anciennement K99 renommé F5, F41) permettent la colonisation et la fabrication d'entérotoxines dans l'intestin grêle, on observe alors une perturbation de la perméabilité des cellules intestinales avec un passage important d'eau et d'électrolytes du sang vers les fèces en formation, on peut également observer une septicémie avec invasion des ganglions mésentériques et éventuellement d'autres organes (Ravary, Sattler, Roch 2006) ;

- *E. coli* productrice de shigatoxines (STEC : Stx1) dont font partie les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) : on observe une association de facteurs d'attachement et d'effacement ainsi que la production de shigatoxines (délétère pour les cellules et responsables des symptômes) potentiellement associé à un effet immunosuppresseur (Francoz, Nichols, Schelcher 2017) ;

- *E. coli* entéropathogènes (EPEC) : des lésions d'attachement et d'effacements au niveau des microvillosités intestinales sont observées (Lacroute 2016) ;

- *E. coli* entéroinvasives (EIEC) : un envahissement des entérocytes est observé (seulement chez l'homme et le primate à ce jour) (Lacroute 2016) ;

- *E. coli* attachement – effacement (AEEC : O111, O5, O26) : les bactéries adhèrent aux apex des cellules du colon et du caecum et entraînent un effacement des microvillosités intestinales, on retrouve également une production de différentes toxines ayant une action locale (Ravary, Sattler, Roch 2006) :

- *E. coli* entéroaggrégatifs (EAaggEC).

Parmi eux seulement 3 pathotypes ont un rôle démontré dans les DN, ce sont les ETEC, les AEEC, et les STEC (Francoz, Nichols, Schelcher 2017).

Et parmi ces bactéries, la cause la plus fréquente de DN est la souche ETEC qui produit l'antigène d'adhésion F5 (anciennement appelée *E. coli* K99+, et maintenant nommé *E. coli* F5) et entérotoxine thermostable. Il convient de noter que d'autres groupes pathogènes d'*E. coli*, qui

sont généralement identifiés par histopathologie, peuvent être manqués si le diagnostic se concentre sur *E. coli* F5 seul (Cho, Yoon 2014).

La contamination des veaux nouveau-nés se fait majoritairement par la voie fécale/orale après excrétion des souches virulentes par les mères. Ces veaux deviennent alors une source de contamination de l'environnement par leurs fortes excréments du virus (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

Dans les DN à *E. coli* on retrouve le plus fréquemment le pathotype ETEC. En effet les veaux nouveau-nés y sont plus sensibles dans leurs quatre premiers jours de vie. Cela entraîne en général une diarrhée aqueuse après infection (Cho, Yoon 2014). Une co-infection avec le rotavirus peut élargir la période de sensibilité du veau jusqu'à 14 jours d'âge. Les AEEC et STEC sont aussi responsables de diarrhées chez les veaux, associées parfois à de la douleur abdominale et à une déshydratation. En revanche, la prévalence de ces deux bactéries et leurs causalités dans les DN ne sont pas clairement définies (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

La diarrhée résulte d'une sécrétion exacerbée, ou d'une baisse de l'absorption dans le tube digestif. Les colibacilles causent des diarrhées par leur sécrétion d'entérotoxines qui entraîne une perturbation de la perméabilité cellulaire et un passage d'eau et d'électrolytes vers la lumière intestinale (accroissement des sécrétions intestinales) (Ravary, Sattler, Roch 2006). Puis, l'excès de nutriments non digérés est fermenté dans le gros intestin, provoquant une prolifération bactérienne, et la formation d'acides organiques et d'autres composés toxiques. L'effet osmotique de ces composés entraîne un appel d'eau vers la lumière du tube digestif, contribuant ainsi à la diarrhée (Bradford P. Smith, Pusterla 2019). La diarrhée est aqueuse et généralement jaune paille, mais peut également être mucoïde hémorragique (Ravary, Sattler, Roch 2006).

On retrouve ainsi une atrophie de la villosité intestinale et une atteinte de la lamina propria dans les lésions fréquemment causées par les ETEC (Cho, Yoon 2014).

3. Clostridium perfringens

Les bactéries appartenant au genre Clostridium ne sont que rarement responsables de DN. Parmi elles, Clostridium perfringens (*C. perfringens*) est l'agent principalement responsable de maladie entérique chez les veaux (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

C. perfringens est une bactérie anaérobie à Gram positif, sporulée, qui provoque un large éventail de maladies chez les mammifères et les oiseaux (Cho, Yoon 2014).

Ces micro-organismes peuvent être subdivisés en cinq groupes (A, B, C, D et E) selon le type de toxines principales qu'ils sécrètent : alpha (α), bêta (β), epsilon (ϵ) et iota (ι). Les souches de type A produisent la toxine α , les souches de type B produisent des toxines α , β et ϵ ; les souches de type C fabriquent des toxines α et β ; les souches de type D sécrètent des toxines α et ϵ ; et les souches de type E produisent des toxines α et ι . Parmi ces groupes, le type C a été fréquemment identifié comme responsable de diarrhée chez le veau, mais pas aussi fréquemment que certains autres agents pathogènes entériques tels que les rotavirus bovin, le coronavirus bovin, *E. coli*, *Salmonella spp.* et *C. parvum* (Cho, Yoon 2014).

La toxine α est la plus létale, elle hydrolyse les membranes phospholipidiques entraînant une lyse cellulaire. La toxine β est hautement sensible à la trypsine et induit une nécrose des muqueuses intestinales. Elle est reconnue comme ayant le plus d'importance dans la virulence de la bactérie. La toxine ϵ est responsable d'entérotoxémie létale chez les animaux domestiques. Et la toxine ι est responsable de nécrose du derme due à sa haute perméabilité vasculaire (Cho, Yoon 2014).

Les entérotoxines entraînent de la diarrhée ainsi que des crampes intestinales en raison de ses effets sur la protéine des jonctions épithéliales (Cho, Yoon 2014).

Les veaux nouveau-nés ne sécrètent que peu d'enzymes protéolytiques tels que la trypsine, favorisant les infections à *C. perfringens* de type C. On retrouve alors des lésions de type : entérite multifocale hémorragique, nécrotique et ascite (Cho, Yoon 2014).

iii. Les parasites

1. Cryptosporidiose

Cryptosporidium spp. et la cryptosporidiose du jeune veau sont le sujet central de ce travail. Ainsi une présentation plus approfondie du parasite et de la maladie est effectuée ultérieurement et seulement une brève introduction de cet agent est réalisée dans cette partie.

Les protozoaires du genre *Cryptosporidium* sont reconnus comme des agents pathogènes majeurs qui infectent un large éventail d'hôtes (mammifères, reptiles, etc.), dont l'homme. Ce parasite provoque une maladie, qui se caractérise par des épisodes de diarrhée chez l'homme et le bétail. L'espèce *Cryptosporidium parvum* est considérée comme l'une des espèces entéropathogènes les plus courantes chez l'homme et les ruminants. Chez les hôtes humains immunocompétents, l'infection est généralement aiguë et autolimitée. Chez les individus immunodéficients, tels que les personnes recevant des médicaments

immunosuppresseurs ou les patients atteints du VIH, la cryptosporidiose peut se manifester par un syndrome diarrhéique important (Rieux et al. 2013).

Chez les ruminants, qui représentent un secteur important de l'économie agricole dans de nombreux pays, la cryptosporidiose est une cause reconnue de DN. Actuellement, peu de traitements sont disponibles (et d'efficacité contestée), et la résistance élevée des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'environnement rend la cryptosporidiose difficile à contrôler (Rieux et al. 2013).

2. Giardiose

La giardiose, maladie présente chez le jeune veau, est due à un parasite nommé *Giardia duodenalis*. Il a un cycle monoxène et se trouve au niveau du jéjunum, voire de l'iléon.

Le pouvoir pathogène de *Giardia* est peu connu chez les ruminants mais il serait responsable d'un syndrome de maldigestion – malabsorption (Francoz, Nichols, Schelcher 2017). Une des hypothèses sur l'origine de la contamination du veau serait une transmission mère – veau lors des repas. Il est possible d'observer une co-infection entre *Giardia* et *Cryptosporidium* (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

3. Coccidiose

Les parasites à l'origine des coccidioses appartiennent au genre *Eimeria*. Cette maladie peut être causée par deux espèces chez les bovins : *Eimeria bovis* et *Eimeria zuernii*. L'oocyste a une taille de 15 à 20 μm . Le parasite a un cycle monoxène et se trouve généralement en intracellulaire dans les cellules épithéliales du colon et du caecum (Francoz, Nichols, Schelcher 2017). La période prépatente dure de 15 à 20 jours. Généralement, les veaux présentant la maladie ont plus de 3 semaines d'âge. Ce parasite, contrairement à *Cryptosporidium*, ne possède pas la capacité d'auto-infecter son hôte (Francoz, Nichols, Schelcher 2017).

b. Les co-infections

Les co-infections sont fréquemment observées chez les veaux diarrhéiques, bien qu'un seul agent pathogène primaire puisse en être la cause dans certains cas. La prévalence de chacun des agents pathogènes et l'incidence de la maladie peuvent varier en fonction de la situation géographique des exploitations, des pratiques de gestion agricole et de la taille du troupeau (Cho, Yoon 2014).

Il est ainsi courant d'identifier dans un même cheptel plusieurs agents infectieux, voire de les retrouver sur un même veau. En effet, 20 à 30 % des jeunes veaux en diarrhée portent 2 agents pathogènes (Institut de l'élevage 2008). De plus, la présence de plusieurs pathogènes plutôt qu'un seul agent infectieux peut être responsable d'un nombre conséquent des diarrhées néonatales chez le veau, probablement en submergeant les défenses de l'hôte (Francoz, Nichols, Schelcher 2017).

Une étude s'est intéressée aux agents pathogènes responsables de diarrhée chez le veau aux Etats-Unis. Ils ont ainsi prélevé des fèces dans 65 élevages différents. Les veaux inclus dans l'étude étaient classés en 2 catégories : diarrhéique ou sain. Les chercheurs ont collecté 199 échantillons de veaux malades et 245 échantillons de veaux sains au total. Ils ont recherché la présence de 11 agents pathogènes : rotavirus, coronavirus, BVDV, entérovirus, norovirus, nebovirus, torovirus, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *C. perfringens* et *C. parvum*. Ils ont montré que 80 % des veaux présentant de la diarrhée étaient positifs à au minimum un agent pathogène, soulignant le fait que les causes infectieuses sont une cause importante des diarrhées du veau. Les deux agents majoritaires étaient *C. parvum* et le rotavirus. Mais ils ont surtout trouvé que plus de 50 % des veaux malades étaient positifs à plusieurs agents pathogènes (de 2 à 6), dont 28,1 % liés à *C. parvum* et un virus, démontrant l'importance des co-infections dans les DN (Cho et al. 2013).

Une autre étude réalisée en France, dans les Deux-Sèvres, par Rieux et al. a investigué les co-infections chez 32 veaux de 1 à 3 semaines de vie dans un même élevage allaitant. Les veaux étaient sélectionnés dans l'étude s'ils étaient positifs à *Cryptosporidium* (Test d'immunofluorescence). Les fèces étaient collectées une fois par semaine de la naissance à 1 mois de vie. À la suite des résultats positifs, les fèces des veaux étaient testées avec un kit immunochromatographique pour trois agents pathogènes : rotavirus, coronavirus et *E. coli* F5. Finalement, sur 35 échantillons de fèces diarrhéiques, 43 % (15/35) ont présenté une co-infection : 5 avec rotavirus, 7 avec coronavirus, 2 avec *E. coli*, et 1 avec rotavirus, coronavirus et *E. coli* (Rieux et al. 2014).

Une autre étude menée en France, dans l'Allier, par le Groupement Technique Vétérinaire (GTV) a cette fois recherché des agents pathogènes chez 192 veaux de moins de 8 jours, n'ayant pas reçu d'antibiotiques. Les veaux étaient également classés en 2 catégories : « malade » (présence de diarrhée et/ou de septicémie) ou « témoin » (d'apparence asymptomatique) lors du prélèvement de leurs fèces par un vétérinaire. 130 veaux malades et 62 veaux témoins ont ainsi été prélevés. Ils ont recherché par test ELISA, microscopie ou culture bactérienne, quatre agents pathogènes : rotavirus et coronavirus, *Cryptosporidium* et *E.*

coli. L'étude a montré que 62 % des veaux étaient positifs à une infection unique et 38 % étaient positifs à plusieurs agents pathogènes (de 2 à 4). En effet, 30 % des veaux présentaient une infection avec 2 agents pathogènes identifiés : 9 % *E. coli* et rotavirus, 11 % *E. coli* et coronavirus puis 10 % *E. coli* et *Cryptosporidium*. Et 7,5 % des veaux ont présenté une infection avec 3 agents pathogènes identifiés : 3 % *E. coli*, rotavirus et coronavirus, 1,5 % *E. coli*, rotavirus et *Cryptosporidium* ainsi que 3 % *E. coli*, coronavirus et *Cryptosporidium*. Finalement, un seul veau a présenté une infection aux 4 agents pathogènes recherchés. De plus, parmi ces 30 % de veaux présentant une co-infection, 94 % étaient placés dans le groupe malade à la différence de 51 % pour les veaux présentant une infection unique (Lacroute 2016). Ces résultats peuvent être considérés comme sous-évalués du fait de la recherche de seulement 4 agents pathogènes, soulignant la place importante des co-infections dans les DN chez le veau.

C. Les diarrhées d'origine alimentaire

Pour une bonne santé des mères comme du veau, une bonne alimentation est essentielle. C'est pourquoi, lors de diarrhée observée chez le veau, l'alimentation des vaches dans leurs dernier tiers de gestation doit être analysée. En effet des carences en oligoéléments peuvent favoriser les risques d'infections du veau nouveau-né. De même l'utilisation d'aliments d'allaitement augmente le risque d'apparition de diarrhées (Francoz, Nichols, Schelcher 2017).

L'ingestion d'une quantité trop importante de lait pourrait occasionner des diarrhées dites d'origine alimentaire. Cette ingestion trop importante peut être due à une mauvaise gestion de la séparation mère – veau, ou à une mauvaise gestion de la distribution de lait au veau par l'éleveur lui-même (veau orphelin, veau malade, veau laitier). Ne pas dépasser les limites de l'intestin grêle du veau nouveau-né est important pour ne pas provoquer une diarrhée. Cette ingestion de lait en trop grande quantité entraîne la présence de lait dans le colon. Il va alors fermenter et produire des molécules à activité osmotique et ainsi induire une diarrhée (Bradford P. Smith, Pusterla 2019).

D. Les facteurs de risques des diarrhées néonatales

Une bonne prévention des DN passe par une bonne connaissance des facteurs de risques. Or la plupart des agents pathogènes responsables de la DN sont capables de résister plusieurs mois si les conditions sont favorables (notamment pour les rotavirus, les cryptosporidies, les *E. coli* et *Salmonella spp.*). De bonnes pratiques d'élevage sont donc nécessaires pour diminuer les risques de DN chez les veaux (*Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole* 2011).

a. Transmission de l'immunité passive

i. Le colostrum

Les veaux naissent agammaglobuliniques. Ils acquièrent une immunité passive contre les agents courants de la diarrhée des veaux après avoir absorbé des anticorps provenant du colostrum ou des compléments de colostrum peu après la naissance. La quantité d'anticorps absorbés est déterminée par la qualité et la quantité de colostrum que le veau ingère et par le moment où il l'ingère après la naissance (Smith 2012).

Pour assurer une bonne protection contre les agents pathogènes responsables de diarrhée, il est nécessaire d'avoir une présence continue d'anticorps au site de l'infection (dans la lumière intestinale). Par ailleurs, dans les premiers jours de vie, quand le veau rencontre des agents pathogènes il va développer une réponse immunitaire active, qui ne sera entièrement efficace que 2 ou 3 semaines après l'infection. L'immunité passive du veau est donc transmise par le colostrum dans les 48 à 72h suivant la naissance. Toutefois le lait maternel joue également un rôle dans la protection du veau, car il contient aussi des anticorps (mais en quantité nettement plus faible que le colostrum). C'est pour cela qu'un défaut de transfert de l'immunité passive peut favoriser les infections intestinales et donc de la diarrhée (*Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole 2011*).

1. Statut des mères

Le colostrum ne protège les veaux contre les infections par les espèces de *Salmonella*, les rotavirus, les coronavirus et les souches pathogènes d'*E. coli* que s'il contient des immunoglobulines spécifiques contre ces organismes (Bazeley 2003). La présence d'anticorps maternels contre des agents spécifiques dans le colostrum exige que la mère ait été préalablement exposée aux antigènes de l'agent (Smith 2012). Ainsi l'âge de la mère est important pour le risque de DN chez le veau. Les veaux nés de génisses présentent un risque plus élevé de DN, ils ont en effet des niveaux d'anticorps maternels plus faibles que les veaux nés de vaches plus âgées (Smith 2012).

Une étude a montré qu'un pourcentage à peu près égal de vaches et de génisses excrétaient des agents pathogènes mais qu'un pourcentage plus élevé de veaux nés de génisses développait des signes de diarrhée (Schumann, Townsend, Naylor 1990).

Les vaccins sont utilisés pour immuniser la mère contre des agents spécifiques, et certains suppléments de colostrum disponibles dans le commerce contiennent des anticorps

polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre des agents spécifiques (Smith 2012). La vaccination des vaches contre les entéropathogènes (en général dans le dernier tiers de gestation) augmente le taux d'anticorps présents contre ces agents chez la vache et donc dans le colostrum. Cela permet de réduire significativement le risque de DN chez leurs veaux (Al Mawly et al. 2015). Malheureusement, l'utilisation de vaccins ou de suppléments de colostrum ne permet pas toujours de prévenir la DN du veau (les vaccins n'étant pas disponibles contre tous les agents pathogènes de la DN ; n'induisant pas une réponse immunitaire suffisante ; les pathogènes pouvant évoluer de manière à échapper aux vaccins) (Smith 2012).

2. Qualité et quantité de colostrum ingéré

L'incidence et la gravité de la maladie dépendent fortement du niveau de protection colostrale que le veau a reçu, bien que cette protection puisse être de courte durée pour certains agents infectieux comme le rotavirus (Bazeley 2003). Celui-ci dépend notamment de la qualité et de la quantité de colostrum ingéré par le veau. Or, la pulsion de succion et la vigueur du veau, la conformation de la mamelle et des trayons et un mauvais allaitement influencent la prise effective d'un colostrum adéquat (Schumann, Townsend, Naylor 1990). La prise d'un colostrum de qualité est aussi dépendante de bonnes installations de vêlage pour minimiser les blessures des vaches et l'épuisement des veaux, de l'isolement du couple mère/veau pour assurer la tétée et de l'observation attentive du couple par l'éleveur pour s'assurer de la prise de colostrum (Bazeley 2003).

Les veaux nés de génisses sont plus sensibles aux DN certainement parce que les génisses produisent un volume de colostrum inférieur et de moins bonne qualité par rapport aux vaches plus âgées (Schumann, Townsend, Naylor 1990) De plus les génisses peuvent avoir de moins bonnes aptitudes maternelles, et sont également plus susceptibles de souffrir de dystocie (Smith 2012). Ce taux de dystocie plus élevé, se traduit par une augmentation de l'épuisement, de l'affaiblissement et de l'enflure de la langue de leurs veaux. Toutes ces conditions rendent alors l'allaitement plus difficile (Schumann, Townsend, Naylor 1990).

Chez les veaux de 9 à 21 jours de vie, Al Mawly et al. ont observé que les veaux des exploitations déclarant administrer le colostrum dans les 2 premières heures de vie du veau avaient moins de chances d'avoir de la diarrhée que les veaux des exploitations déclarant administrer le colostrum dans les 6 heures (Al Mawly et al. 2015). Ainsi la quantité et la qualité de colostrum ingéré ne sont pas les seuls facteurs influençant une bonne transmission de l'immunité passive au veau. La même équipe a également observé que l'administration du

premier colostrum (fraichement trait) a également été associée à une diminution du risque de diarrhée par rapport au colostrum stocké ou mélangé. Retarder la prise de colostrum diminue l'absorption intestinale des immunoglobulines et des vitamines liposolubles, et les résultats de leurs études soulignent l'importance d'administrer le premier colostrum le plus tôt possible après la naissance. (Al Mawly et al. 2015).

Une fois que le veau a survécu aux premières semaines cruciales, la protection colostrale devient moins importante. Un veau commence normalement à produire des immunoglobulines (Ig) à partir de l'âge de quatre semaines environ, mais la production d'Ig peut commencer beaucoup plus tôt (même au cours de la première semaine de vie) si l'apport de colostrum a été faible. D'autres facteurs augmentent la susceptibilité du veau à la diarrhée, notamment les maladies intercurrentes, le stress et les carences en oligo-éléments (Bazeley 2003).

b. Bâtiment et environnement

Le taux et l'ampleur de l'exposition aux agents pathogènes ainsi que la capacité du veau à résister aux diarrhées peuvent être affectés par les conditions environnementales. L'exposition aux agents pathogènes peut se produire par contact direct avec d'autres bovins ou par contact avec des surfaces environnementales contaminées. L'hygiène de l'environnement est depuis longtemps reconnue comme importante pour contrôler la DN des veaux (Smith 2012).

i. Lieu et saison de vêlage

Un contact effectif est une exposition à des agents pathogènes dont la dose ou la durée est suffisante pour provoquer une maladie. Les conditions de promiscuité augmentent les possibilités de contacts efficaces avec des animaux infectés ou des surfaces contaminées. La température ambiante (chaleur ou froid excessif) et l'humidité (boue ou neige) sont des facteurs de stress importants qui diminuent la capacité du veau à résister à l'infection et peuvent influencer le nombre d'agents pathogènes ainsi que les possibilités d'ingestion orale (Smith 2012). En effet le stress entraîne la libération de cortisol, une hormone qui réduit la réponse immunitaire et la résistance aux infections (Bazeley 2003). Ainsi le lieu et la saison où les veaux viennent au monde influencent leurs chances d'avoir de la diarrhée plus tard. Par exemple, un box de vêlage incorrectement utilisé (non nettoyé et non désinfecté entre 2 mises bas successives, voire insuffisamment paillé), lors des vêlages au bâtiment, entraîne une augmentation des risques de DN (*Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole* 2011).

De plus, le taux de mortalité est plus élevé chez les veaux nés de génisses que chez les veaux nés de vaches. Une des explications seraient que les génisses sont probablement plus étroitement confinées pendant la saison de vêlage pour une meilleure observation et une assistance plus rapide à la parturition. Ces conditions peuvent entraîner une contamination accrue de l'environnement, de la panse et de la mamelle, et ainsi exposer les veaux nouveau-nés à un risque plus élevé (Schumann, Townsend, Naylor 1990).

Schumann et al. observent également que les chances d'une mortalité élevée due à la diarrhée était 3,6 fois plus élevées dans les fermes qui hivernaient les vaches et les génisses ensemble, par rapport aux fermes où ces groupes étaient hivernés séparément.

Les facteurs de risque liés au temps peuvent être associés au temps calendaire ou au temps relatif. La susceptibilité de l'hôte, l'exposition aux agents pathogènes et la transmission des agents pathogènes se produisent de manière dynamique au cours du calendrier, pendant la saison de vêlage dans les troupeaux de bovins et au cours des saisons dans les laiteries. Bien que le troupeau de vaches adultes serve probablement de réservoir d'agents pathogènes de la DN d'une année à l'autre, la dose moyenne d'exposition des veaux aux agents pathogènes est susceptible d'augmenter au fil du temps au cours d'une saison de vêlage, car les veaux infectés plus tôt servent de multiplicateurs d'agents pathogènes et deviennent la principale source d'exposition des veaux sensibles plus jeunes. Cet effet multiplicateur peut entraîner une infectivité élevée des veaux et une contamination généralisée de l'environnement par des agents pathogènes. Chaque veau sert de milieu de croissance pour la production d'agents pathogènes, amplifiant la charge de dose de l'agent pathogène qu'il a reçu. Par conséquent, les veaux nés plus tard dans la saison de vêlage peuvent recevoir des doses plus importantes d'agents pathogènes et, à leur tour, devenir relativement plus infectieux en développant un nombre encore plus grand d'agents. Finalement, la dose d'agents pathogènes dépasse la capacité du veau à résister à la maladie. Ces facteurs, seuls ou combinés, peuvent expliquer les observations selon lesquelles les veaux nés plus tard dans la saison de vêlage présentent un risque plus élevé de maladie ou de décès (Smith 2012). Gulliksen et al. observent également que la naissance des veaux en hiver par rapport aux autres saisons de l'année entraîne une hausse significative du risque de diarrhée dans les exploitations laitières de Norvège (Gulliksen et al. 2009).

ii. Logement des veaux

Le risque de DN augmente quand différents groupes de veaux d'âges différents sont mélangés, ou quand les logements pour veaux sont surpeuplés (Bazeley 2003).

Chez les veaux de 9 à 21 jours, la probabilité de diarrhée est plus élevée dans les exploitations utilisant des étables ouvertes/partiellement ouvertes que dans celles utilisant des étables fermées. L'exposition aux conditions climatiques hivernales pourrait prédisposer les veaux à l'indigestion et à la diarrhée, et la fourniture d'un abri pourrait améliorer la santé des veaux. (Al Mawly et al. 2015).

Parmi les facteurs environnementaux qui augmentent le risque de diarrhée, on retrouve également l'utilisation d'un sol en caillebotis en béton dans les enclos collectifs par rapport à d'autres types de sol, et le logement des veaux en stalles libres par rapport aux stalles entravées (Gulliksen et al. 2009).

iii. Ventilation

Une ventilation et un renouvellement d'air insuffisants, favorisent l'humidité ambiante, et donc la conservation dans l'environnement de nombreux agents infectieux ainsi que leur concentration dans les aérosols entraînent une hausse du risque de DN chez le veau (*Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole 2011; Bazeley 2003*). De plus, la thermorégulation n'est pas complètement développée chez les jeunes veaux, ils sont donc sensibles à l'hypothermie et deviennent ensuite plus vulnérables (Bazeley 2003).

iv. Gestion de la litière et nettoyage des locaux

Une litière humide, sale et inadéquate permet l'accumulation d'agents pathogènes. La survie de la plupart des agents pathogènes gastro-intestinaux et la maturation des oocystes coccidiens sont optimales dans des conditions humides, fraîches ou chaudes (Bazeley 2003). Certains agents infectieux (notamment les protozoaires) survivent pendant de nombreux mois, même après un nettoyage de routine (Bazeley 2003). Un mauvais drainage de la zone de couchage des veaux est également associé à une augmentation de la probabilité d'une mortalité élevée due à la diarrhée (Schumann, Townsend, Naylor 1990). Ainsi une gestion optimale de la litière et un nettoyage adéquat des locaux est nécessaire pour diminuer le risque de DN.

L'utilisation de paille pour la litière est également associée à une diminution de la fréquence des diarrhées par rapport à la sciure de bois, suggérant que la paille est un matériau de litière plus adapté (Al Mawly et al. 2015).

v. Nettoyage du matériel d'alimentation

Une mauvaise hygiène du matériel d'alimentation (seaux sales et abreuvoirs contaminés) constitue également une source importante d'infection (Bazeley 2003).

c. Alimentation

i. Alimentation des vaches en fin de gestation

L'alimentation des vaches dans le dernier trimestre de gestation impacte la santé du jeune veau. En effet des déficits importants en énergie et en azote (par rapport aux besoins réels) sont préjudiciables pour la santé des veaux dès la naissance (*Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole 2011*).

Des carences en oligo-éléments (vitamines Sélénium/vitamine E) n'ont pas de lien direct avec la diarrhée du veau, mais peuvent augmenter la morbidité associée notamment aux DN. Ces carences impacteraient également la qualité du colostrum et le taux d'Ig dans celui-ci. La résistance à l'infection est réduite en raison de la diminution de la fonction neutrophile et de la réponse immunitaire (Bazeley 2003).

Les veaux carencés en iode naissent généralement morts, mais ceux qui sont vivants peuvent être faibles à la naissance. Ces animaux ne parviennent pas à se tenir debout ou à téter et sont donc très vulnérables aux infections néonatales. Les maladies subcliniques suite à cela peuvent être importantes (Bazeley 2003).

Les carences en vitamine A sont associées à une faiblesse à la naissance et à la cécité. Elles surviennent notamment chez les bovins de boucherie nourris pendant des périodes prolongées avec des fourrages de mauvaise qualité. Elles peuvent également être associée à la mauvaise qualité du colostrum (Bazeley 2003).

ii. Alimentation des veaux en phase d'allaitement

La diarrhée nutritionnelle chez les animaux pré-sevrés se produit si les veaux qui tètent des vaches ingèrent un excès de lait ou si les animaux dans les systèmes d'alimentation automatisés se voient offrir de grandes quantités de lait (Bazeley 2003). La capacité de la caillette du veau nouveau-né n'est que de 1 à 5 litres, et augmente jusqu'à environ 2 litres à la fin de la première semaine.

Les aliments d'allaitement artificiels préparés à une température ou une concentration inadéquate, ainsi que le lait cru donné à des températures différentes ou dont la teneur en

colostrum est variable, peuvent tous deux provoquer des diarrhées. Les veaux peuvent également souffrir de diarrhée si les animaux sont nourris à intervalles irréguliers ou s'il y a une période de famine forcée suivie d'une alimentation profuse. Lorsqu'il n'y a pas d'accès à l'eau fraîche, les veaux assoiffés (par exemple, par temps chaud ou après le transport) peuvent boire trop de lait, ce qui entraîne une diarrhée nutritionnelle. Quelle qu'en soit la cause, l'invasion par des agents pathogènes suit généralement les épisodes de diarrhée nutritionnelle (Bazeley 2003).

Les éleveurs donnant du lait écarté de la traite (provenant de mammites et/ou contenant des antibiotiques) à leurs veaux ont vu le risque de DN chez leurs veaux diminuer selon Al Mawly en 2015, mais ce résultat est à prendre avec précaution notamment dû au risque de développement d'une résistance aux antimicrobiens (Al Mawly et al. 2015).

d. Gestion du troupeau

La qualité de l'élevage est souvent le facteur le plus important qui influence l'incidence et l'évolution des DN. De nombreux cas de diarrhée chez le veau peuvent être évités grâce à de bonnes pratiques d'élevage. Une préparation minutieuse à la mise bas permet de s'assurer que la vache est apte à vêler. Une manipulation habile pendant le vêlage minimisera la probabilité d'une mère malade ou épuisée qui ne parvient pas à nourrir le veau, ou d'un veau faible et en acidose qui ne parvient pas à téter (Bazeley 2003).

i. Gestion des mouvements d'animaux au sein du troupeau

Le regroupement, la vente et le transport des veaux augmentent l'exposition aux agents infectieux (Bazeley 2003).

Ainsi les exploitations achetant des veaux de remplacement âgés de moins de quatre semaines pour les vaches ayant perdu leurs veaux avaient un risque de mortalité élevé 4,3 fois plus élevé que les exploitations n'achetant pas de jeunes veaux dans l'étude réalisée par Schumann et al. en 1990. Les veaux nouvellement introduits peuvent augmenter le niveau de contamination dans les zones de vêlage ou d'allaitement, entraînant une épidémie de diarrhée. Par ailleurs, les éleveurs dont les veaux sont morts de diarrhée ont pu être plus enclins à acheter des veaux de remplacement, pouvant entraîner un biais dans l'étude (Schumann, Townsend, Naylor 1990).

Les introductions régulières d'une forte proportion de bovins adultes, ou la mise en commun de troupeaux avec mélange des microbismes sont également des facteurs de risques pour les DN (*Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole 2011*).

L'identification, l'isolement et le traitement des veaux malades est important dans la gestion des DN. Une mauvaise luminosité ainsi qu'une surdensité de population empêche une bonne identification des malades (Bazeley 2003). Des box d'isollements avec lampes chauffantes sont essentiels pour assurer des soins individuels et pour favoriser un rétablissement rapide (Bazeley 2003).

ii. Maitrise du parasitisme

Une maîtrise insuffisante ou inadaptée du parasitisme, notamment par la grande douve (*Fasciola hepatica*) peut favoriser l'apparition de DN (*Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole 2011*). En effet le parasitisme de la mère diminue la qualité du colostrum par diminution de la teneur en immunoglobulines (Ravary, Sattler, Roch 2006).

e. Autres facteurs de risques

Al Mawly et al. ont remarqué que chez les veaux (âgés de 1 à 5 jours), la probabilité de diarrhée était plus faible dans les exploitations où des femmes s'occupaient des veaux que dans celles tenues par des hommes. Cette observation était en accord avec de précédentes études, ce qui suggère que les femmes pourraient fournir de meilleurs soins que les hommes (Al Mawly et al. 2015).

Ils ont également observé que les velles âgées de 9 à 21 jours avaient moins de chances d'avoir de la diarrhée que les mâles. Alors que les veaux mâles peuvent avoir une faible valeur économique, la valeur des femelles de renouvellement est élevée en système laitier, ce qui peut influencer les soins néonataux. Dans certains systèmes, les taux de dystocie sont plus élevés chez les mâles, ce qui pourrait affecter le transfert passif d'immunoglobulines en raison de la moindre vigueur des veaux et de l'ingestion tardive du colostrum, expliquant peut-être cette différence (Al Mawly et al. 2015).

La même équipe de recherche a noté que leurs modèles de co-infection a apporté un soutien statistique à la notion populaire selon laquelle les co-infections provoquent une diarrhée plus sévère que lors de mono-infections (Al Mawly et al. 2015). En effet certains auteurs ont suggéré que la gravité de la diarrhée augmente en présence de co-infections (de la Fuente et al. 1999).

La présence de maladies concomitantes chez les veaux, souvent due à des facteurs de risque similaires (par exemple, une mauvaise hygiène et une faible consommation de colostrum), peuvent accroître l'exposition aux agents infectieux responsables des DN en augmentant la durée de la maladie ou peuvent réduire la vigueur du veau et/ou sa résistance (par exemple, pneumonie du veau, diarrhée virale bovine) (Bazeley 2003).

On retrouve ainsi de nombreux facteurs de risques pour les diarrhées néonatales chez le veau : les pratiques environnementales et d'élevage, telles qu'un apport insuffisant en colostrum, les types de logement et une mauvaise hygiène.

Partie II : *Cryptosporidium* et sa maladie : la cryptosporidiose

A. Taxonomie et nomenclature

Les espèces du genre *Cryptosporidium* font partie du groupe paraphylétique des protozoaires eucaryotes. Cela signifie que la majorité de leur ADN est contenue dans un noyau à double membrane (Fayer, Xiao 2008). Ce sont des organismes unicellulaires, appartenant au phylum des Apicomplexa, possédant des caractéristiques à la fois des coccidies et des grégarines (Ryan, Xiao 2014). Ce phylum inclue de nombreux parasites responsables de maladies connues, comme le paludisme, la piroplasmose, ou encore la coccidiose à *Eimeria* (Fayer, Xiao 2008).

Dans ce phylum, les genres : *Eimeria*, *Isospora*, *Cyclospora* et *Cryptosporidium*, réalisent leurs cycles parasites dans le tube digestif des vertébrés et ne nécessitent qu'un seul hôte pour perpétuer leurs cycles. D'autres genres du phylum sont eux capables d'avoir une partie de leur cycle en dehors du tube digestif (Barta, Thompson 2006).

Cryptosporidium jusqu'à récemment appartenait à la sous-classe Coccidia avec ces autres genres. Mais il était perçu comme atypique du fait de ses particularités biologiques (oocystes auto-infectant, résistance aux traitements contre les coccidies) (Barta, Thompson 2006). Les dernières avancées en biologie moléculaire ont montré que *Cryptosporidium* avait plus de similarité avec la sous-classe des Gregarinae qu'avec celle des coccidies. De plus ces deux groupes ont un cycle monoxène, des oocystes contenant quatre sporozoïtes, une localisation parasitaire similaire dans le tube digestif de l'hôte et des gamètes ou des trophozoïtes extracytoplasmiques (Barta, Thompson 2006). Leur façon d'acquérir des nutriments (à l'aide d'un organite nourricier multi-membranaire), similaire à celle des grégarines, soutient également l'hypothèse d'une mauvaise identification des liens de parenté des *Cryptosporidium* (Barta, Thompson 2006). Il a donc été proposé de reclasser *Cryptosporidium* dans la classe des Gregarinomorpha et dans une nouvelle sous-classe, les Cryptogregaria (Cavalier-Smith 2014).

Des espèces clairement décrites avec des noms scientifiques stables sont fondamentales et essentielles pour comprendre l'épidémiologie de *Cryptosporidium*. Les principes de dénomination et de stabilité sont fournis par le Code international de nomenclature zoologique (ICZN). Les directives comprennent la nécessité de fournir des données morphométriques sur les oocystes, de fournir une caractérisation génétique, de démontrer la spécificité naturelle et, si possible, expérimentale de l'hôte et de se conformer aux règles de l'ICZN (Ryan, Fayer, Xiao 2014).

Avec l'accumulation de données biologiques et génétiques concernant des génotypes supplémentaires, la définition du genre *Cryptosporidium* a changé pour englober plus de 40 espèces avec des différences marquées dans la gamme d'hôtes, parmi lesquelles plus de 10 ont été rapportées chez l'homme (principalement *C. hominis*, *C. parvum* et *C. meleagridis*), avec une variété de génotypes zoonotiques (Hatam-Nahavandi et al. 2019).

Des études menées dans le monde entier suggèrent que les bovins sont infectés par quatre espèces principales de *Cryptosporidium* : *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* et *C. ryanae* (Xiao, Feng 2017; Xiao 2010). D'autres espèces telles que *Cryptosporidium* *occultus*, *Cryptosporidium* *ubiquitum* et *Cryptosporidium* *xiaoi* ont aussi été décrites dans de rares cas chez des ruminants (Feng, Ryan, Xiao 2018).

Chez certaines espèces, comme *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis*, on retrouve une telle diversité intra-espèce qu'une classification en sous-types ou génotypes a été mise en place. Cette nouvelle nomenclature permet de monitorer cette diversité dans les zones endémiques, ainsi qu'à trouver la source de l'infection lors d'apparition de cryptosporidiose ou encore à évaluer le rôle zoonotique de *Cryptosporidium* dans les études épidémiologiques. Cette nomenclature des sous-types se base sur le séquençage du gène codant pour la glycoprotéine de 60 kDA (gp60) (Xiao, Feng 2017).

Un nom de sous-type commence par la désignation de l'espèce et de la famille de sous-type (Ia, Ib, Id, Ie, If, etc. pour *C. hominis* ; IIa, IIb, IIc, IId, etc. pour *C. parvum* ; IIIa, IIIb, IIIc, IIId, etc. pour *C. meleagridis* ; suivi du nombre de répétitions TCA (représenté par la lettre A), TCG (représenté par la lettre G) ou TCT (représenté par la lettre T). Dans certaines familles de sous-types, les isolats peuvent présenter un nombre identique de répétitions trinuécléotidiques, mais différer les uns des autres par le nombre de copies d'autres séquences répétitives (désignées par R à la fin du nom du sous-type) (Xiao, Feng 2017).

Par exemple le sous-type IIaA15G2R1, retrouvé le plus souvent chez les bovins et les humains (Santín, Trout, Fayer 2008), appartient à *C. parvum*, au sous-type IIa. Il a quinze copies de TCA et 2 copies de TCG, ainsi qu'1 copie de la séquence ACATCA.

B. Cycle de *cryptosporidium* spp

Cryptosporidium possède un cycle monoxène, c'est-à-dire qu'il n'a besoin que d'un seul hôte afin de réaliser son cycle de développement (Khan, Shaik, Grigg 2018). Le cycle commence par l'ingestion d'oocystes, qui sont la forme de résistance et de dissémination de l'agent, puis continue par des phases de multiplication asexuée et de reproduction sexuée, et se

termine par l'excrétion d'oocystes à paroi épaisse dans les fèces. Chez les veaux, le site de prédilection de *C. parvum* est l'iléon, au-dessous de la jonction caecale (Fayer, Xiao 2008).

Chez le veau, le cycle débute par l'ingestion d'oocystes contaminant, présent dans le milieu environnant. Après ingestion, le désenkystement a lieu : les oocystes vont libérer quatre sporozoïtes à l'intérieur du tube digestif. Cette étape est stimulée par divers facteurs tels que le dioxyde de carbone, la température, les enzymes pancréatiques ou les sels biliaires. Le sporozoïte va ensuite permettre l'infection des cellules cibles (Ghazy, Shafy, Shaapan 2015).

Les sporozoïtes se déplacent par glissement, grâce à un système de microtubules (Rieux 2013). Les sporozoïtes atteignent ainsi la bordure en brosses des entérocytes, où le cycle se poursuit. Le parasite va se lier à la surface apicale de la cellule grâce à un organe d'attachement (et/ou organe nourricier), spécifique du genre *Cryptosporidium*. Le contact avec le parasite induit des modifications localisées de la membrane plasmique de la cellule, avec une perte de la microvillosité et la formation d'un pli membranaire circulaire qui va entourer progressivement le parasite vers son bord apical. C'est la formation de la membrane parasitophore (Valigurová et al. 2008). Les sporozoïtes deviennent alors des trophozoïtes.

Le cycle suit son cours avec la multiplication asexuée des trophozoïtes, la schizogonie ou mérogonie. Le trophozoïte évolue en méronte. *C. parvum* possède deux types de méronte. À la suite d'une première multiplication asexuée, le trophozoïte devient un méronte de type I. Cette forme contient six à huit cellules filles appelées mérozoïtes de type I (Fayer, Xiao 2008). Le mérozoïte de type I peut ensuite soit reformer des mérontes de type I et participer à un phénomène de rétroinfection, soit envahir une cellule voisine et former un méronte de type II. Les mérontes de type II ont 4 cellules filles, appelées mérozoïtes de type II (Rieux 2013).

Les mérozoïtes de type II ne participent pas à la multiplication asexuée mais commencent la reproduction sexuée en évoluant en gamontes. C'est la gamétogonie. Elle permet la différenciation des mérozoïtes de type II en microgamontes mâles 36 heures post-infection ou en macrogamontes femelles 48 heures post-infection (Rieux 2013). Les microgamontes sont plurinucléés et peuvent produire jusqu'à seize microgamètes non-flagellés. Les macrogamontes restent uninucléés et produisent une macrogamète, qui va être fécondée par un microgamète. Il y a alors formation d'un zygote qui, après sporogonie, devient un oocyste mature à quatre sporozoïtes. 80 % des oocystes créés sont à paroi épaisse et seront excrétés dans les fèces. Les 20 % qui restent sont des oocystes à paroi fine et assurent une partie du phénomène d'auto-infection (Ghazy, Shafy, Shaapan 2015).

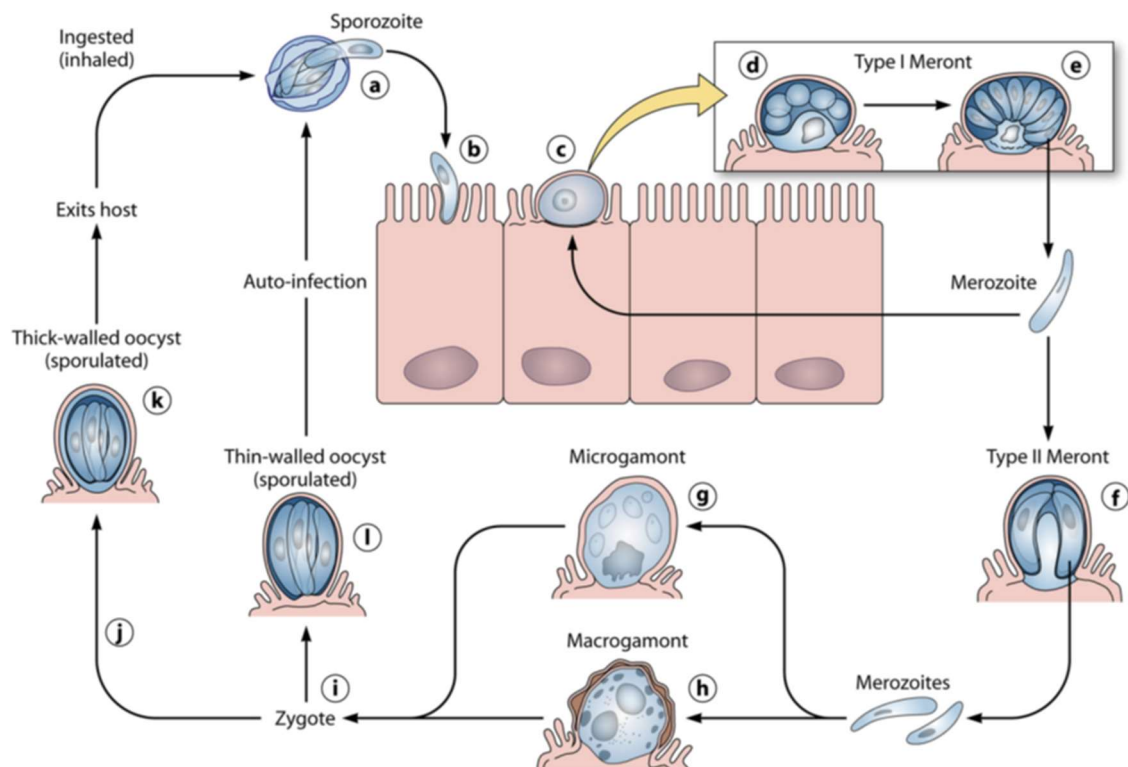


Figure 1 : Représentation schématique du cycle de vie de *Cryptosporidium parvum*.

Après avoir été exocytés des oocystes dans la lumière de l'intestin (a), les sporozoïtes (b) pénètrent dans les cellules de l'hôte et se développent en trophozoïtes (c) à l'intérieur de vacuoles parasitophores confinées aux microvillosités de l'épithélium muqueux. Les trophozoïtes subissent une division asexuée (mérogonie) (d et e) pour former des mérozoïtes. Après avoir été libérés des mérontes de type I, les mérozoïtes invasifs pénètrent dans les cellules hôtes adjacentes pour former d'autres mérontes de type I ou pour former des mérontes de type II (f). Les mérontes de type II ne se recyclent pas mais pénètrent dans les cellules hôtes pour former les stades sexuels, les microgamontes (g) et les macrogamontes (h). La plupart des zygotes (i) formés après la fécondation du microgamonte par les microgamètes (libérés du microgamonte) se développent en oocystes (j) résistants à l'environnement, à parois épaisses, qui subissent une sporogonie pour former des oocystes sporulés (k) contenant quatre sporozoïtes. Les oocystes sporulés libérés dans les fèces sont les formes de résistance du parasite qui transmettent l'infection d'un hôte à l'autre. Un plus petit pourcentage de zygotes (environ 20 %) ne forme pas un oocyste à paroi épaisse (avec deux épaisseurs) ; ils ne possèdent qu'une membrane simple, entourant les quatre sporozoïtes. Ces oocystes à fine paroi (l) représentent des formes auto-infectieuses du cycle de vie du parasite qui peuvent le maintenir dans l'hôte sans exposition orale répétée aux oocystes à paroi épaisse présents dans l'environnement. (Bouزيد et al., 2013)

La période pré-patente est le délai le plus court entre l'ingestion d'un nombre d'oocyste suffisant pour provoquer une infection et la première excrétion d'oocystes dans les matières fécales de l'hôte. Cette période varie selon l'hôte, l'espèce de *Cryptosporidium* et le nombre d'oocystes ingérés avant infection. En effet, pour *C. parvum*, la période pré-patente est de 2 à 7 jours chez les veaux et 2 à 22 jours chez les humains ; tandis que pour *C. bovis*, elle est de 10 à 12 jours chez les bovins ; et pour *C. suis*, elle est de 2 à 9 jours chez les cochons (Fayer, Xiao 2008).

a. Morphologie des différents stades parasitaires

i. Les oocystes à paroi épaisses

Les oocystes de *Cryptosporidium* (Figure 2) sont microscopiques (la plupart des espèces ont un diamètre de 4 à 6 μm) et possèdent une paroi cireuse résistante composée de lipides et de glycoprotéines, qui permet au parasite de survivre dans un large éventail de conditions (Innes et al. 2020). Ils sont ainsi la forme de résistance et de dissémination du parasite (Rieux 2013).

Cette paroi a une structure trilaminaire avec une épaisseur d'environ 49 nm. Ces composants lui confèrent une certaine rigidité et élasticité (Fayer, Xiao 2008). La paroi est continue sauf à un seul pôle où elle est interrompue par une ligne de fente. Lors du dékystement, cette fente s'ouvre, et de chaque côté, la paroi se rétracte vers l'intérieur de l'oocyste, laissant passer les sporozoïtes. Lors d'étude *in vitro*, cette étape se réalise directement après l'inoculation (Borowski et al. 2010). Le dékystement est stimulé par le nouveau milieu au niveau de la lumière intestinale (température, enzymes...). Mais la présence de ces facteurs n'est pas essentielle à sa réalisation. En effet, il a été observé que les oocystes, contrairement aux coccidies sont capables de libérer leurs sporozoïtes dans une solution chaude et aqueuse. Cette propriété est probablement la raison pour laquelle ce parasite a été observé dans des zones plus sporadiques, telles que la conjonctive de l'œil, les voies respiratoires, la vésicule biliaire, les nœuds lymphatiques, les testicules, les ovaires, l'utérus ou encore le vagin (Fayer, Xiao 2008).

A l'intérieur de la paroi, il reste un corps résiduel et quatre sporozoïtes encerclés par une membrane. Le corps résiduel contient un corps large lipidique, des granules d'amylopectines, des inclusions cristallines protéiques, des ribosomes et des cytomembranes (Fayer, Xiao 2008).

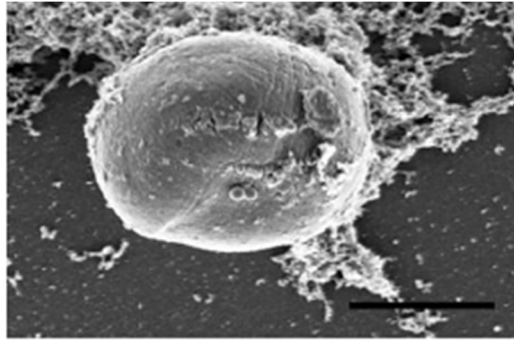


Figure 2 : Image en microscopie électronique à balayage d'un oocyste intact (Borowski et al., 2010)
Echelle : 4 μ m

ii. Les sporozoïtes

Les sporozoïtes (*Figure 3*) sont la forme invasive de *Cryptosporidium*. Sa structure permet l'attachement aux cellules cibles puis leur infection. Les régions basales et apicales du parasite se distinguent morphologiquement. Des images de *C. parvum* ont pu montrer une région basale élargie et une région apicale fine et allongée (Borowski et al. 2010).

Les organites responsables de la liaison à la cellule hôte se trouvent en région apicale, avec notamment la rhoptrie, des micronèmes et des granules denses. L'appareil de Golgi, le noyau, les granules d'amylopectines et les ribosomes, sont eux, plus au centre du sporozoïte (Fayer, Xiao 2008).

Les microtubules sous-pelliculaires permettent le déplacement des sporozoïtes en glissant sur la surface des cellules (*Figure 4*). Des trames de ces déplacements peuvent être visualisées par imagerie, grâce aux anomalies observées aux niveaux des microvillosités. Les anomalies retrouvées, comme l'élongation des microvillosités entre un oocyste dékysté et un trophozoïte, sont la représentation physique du cheminement du parasite à la surface de la

cellule (Borowski et al. 2010). Les sporozoïtes peuvent envahir les cellules directement sous-jacentes ou les cellules avoisinantes, cette motilité n'est pas un prérequis à l'invasion cellulaire.

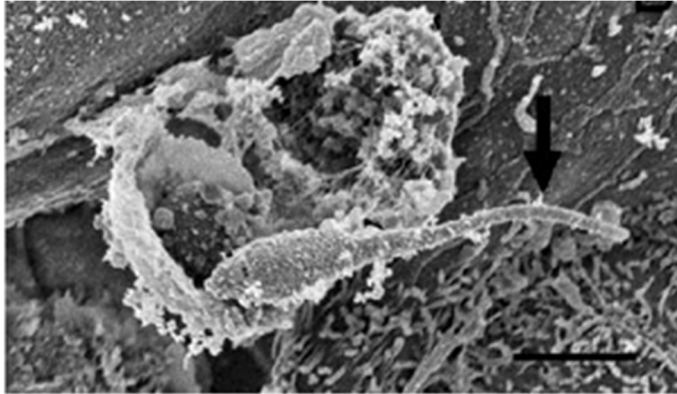


Figure 4 : Image en microscopie électronique à balayage d'un désenkystement d'oocyste 48h post inoculation (Borowski et al., 2010)

Echelle : 2 μ m

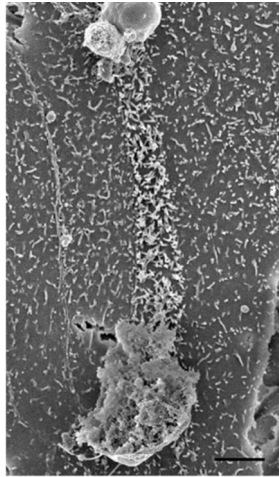


Figure 3 : Image en microscopie électronique à balayage d'une trace de glissement composée de microvillosités allongées entre un oocyste désenkysté et des trophozoïtes 3 jours après l'inoculation (Borowski et al., 2010)

Echelle : 2 μ m

iii. La membrane parasitophore

Normalement, la membrane parasitophore (*Figure 5*) est acquise en changeant morphologiquement la membrane plasmique de la cellule cible après attachement du sporozoïte. La membrane plasmique perd sa microvillosité puis forme un pli membranaire qui va s'enrouler progressivement autour du parasite. La surface de la membrane est généralement lisse, avec parfois des plis radiaux irréguliers à sa base. On peut observer des pores au sein de la membrane (Valigurová et al. 2008).

Toutefois, il a été montré que *Cryptosporidium* avait également la capacité de créer une membrane parasitophore indépendamment de toute cellule hôte, au sein d'un biofilm. La membrane parasitophore serait similaire à celle observée dans les précédentes études *in vitro* et *in vivo* (Koh et al. 2014). Une hypothèse serait que la membrane parasitophore ne dériverait finalement pas que de la membrane plasmique de la cellule, mais qu'elle serait formée à partir de composants de la cellule hôte et du parasite (Borowski et al. 2010).

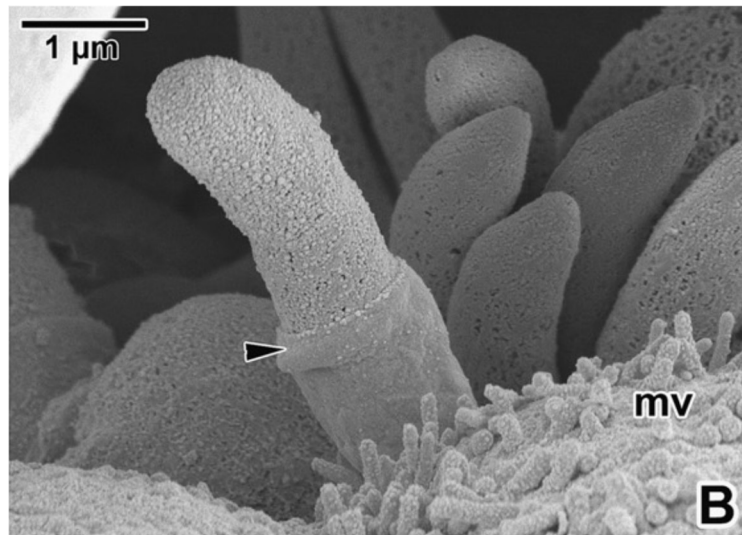


Figure 5 : Image en microscopie électronique à balayage de sporozoïtes de *Cryptosporidium muris* avec formation de la membrane parasitophore (flèche) (Valigurova et al., 2008)
mv : microvillosités

iv. Les trophozoïtes

Les trophozoïtes (*Figure 6*) ont un noyau (comportant un gros nucléole), entouré par le cytoplasme, et un organite nourricier mature. Cet organite permet au parasite d'acquérir depuis

la cellule hôte, les nutriments dont il a besoin (Fayer, Xiao 2008). Une étude *in vitro* a observé l'apparition des trophozoïtes dès 6 heures post-inoculation (Borowski et al. 2010).

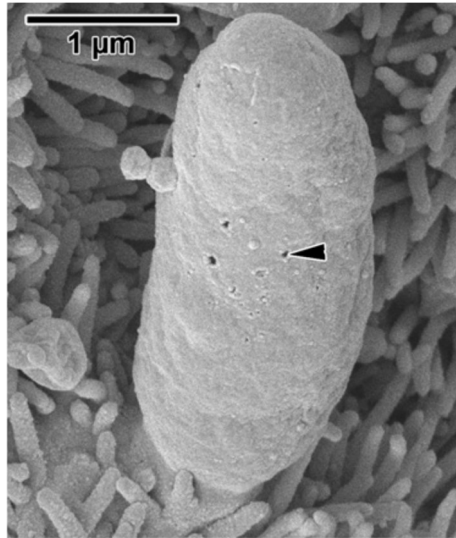


Figure 6 : Image en microscopie électronique à balayage d'un trophozoïte en cours de maturation, complètement entouré par la membrane parasitophore, avec visualisation de structures similaire à des pores (flèche) (Valigurova et al., 2008)

v. Les mérontes et les mérozoïtes type I et II

Les mérontes sont la forme finale de la reproduction asexuée du parasite. Les mérontes de type I apparaissent après une première multiplication et les mérontes de type II après une deuxième multiplication (Rieux 2013). Les mérontes de type I (*Figure 7*) contiennent 6 à 8 mérozoïtes de type I alors que les mérontes de type II n'ont que 4 mérozoïtes. Une étude a observé l'apparition des mérozoïtes de type I dès 24h post-inoculation. Les mérozoïtes de type II sont eux apparus après 3 jours post-inoculation (Borowski et al. 2010). Les mérozoïtes restent attachés par un corps résiduel et deviennent plus allongés au cours de leur maturation. Dans le même laps de temps, une paire de rhoptries, des micronèmes, des granules denses et des ribosomes se forment dans le cytoplasme (Fayer, Xiao 2008).

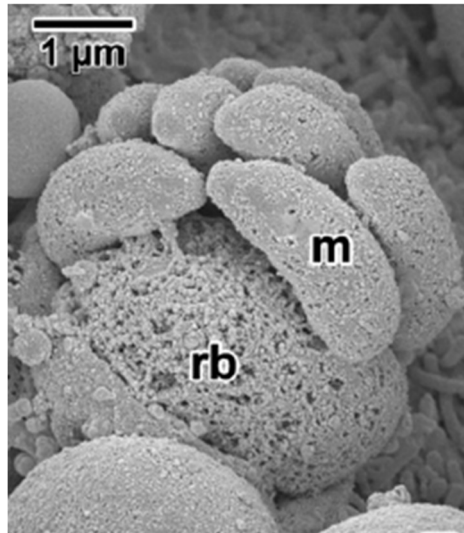


Figure 7 : Méronte de type I (Valigurová et al., 2008)
m : mérozoïte de type I
rb : corps résiduel

vi. Les gamontes

1. Les microgamontes

Les microgamontes sont plus ardues à observer que les autres stades, dû à leur court temps de vie. Les microgamontes immatures sont similaires aux mérontes mais contiennent plusieurs noyaux compacts (Rieux 2013). La membrane est doublée au niveau des sites de formation des futurs microgamètes, tout en restant attachée à la surface du gamonte. Lorsqu'ils sont matures, les microgamètes se séparent de la surface du gamonte, laissant le corps résiduel enveloppé dans une membrane, avec des ribosomes, du réticulum endoplasmique et quelques micronèmes (Fayer, Xiao 2008).

On obtient ainsi jusqu'à 16 microgamètes produits par microgamonte (Ghazy, Shafy, Shaapan 2015). Ils ont une forme allongée avec une région antérieure plus aplatie. Ils ne possèdent pas de flagelles ou de mitochondries, effectivement, la grande partie du microgamète est son noyau condensé. Ils sont entièrement entourés par une membrane plasmique (Fayer, Xiao 2008).

2. Les macrogamontes

Les macrogamontes de *C. parvum* font entre 4 et 6 μm et ont une forme sphérique à ovoïde. Ils sont constitués d'un large noyau central (comprenant un nucléole important), de

corps lipidiques, de granules d'amylopectines et d'agents dédiés à la formation de la paroi (Fayer, Xiao 2008).

Le processus de fertilisation de la macrogamète par le microgamète n'est pas connu pour le moment. Il est supposé être rapide, avec l'attachement du microgamète via leur surface apicale. Il passerait à travers les membranes et entrerait dans le cytoplasme de la macrogamète. La fusion des noyaux n'a également jamais été observée (Fayer, Xiao 2008). La fécondation des macrogamètes par les microgamètes conduit à la production de zygotes qui, après deux divisions asexuées, développent soit un oocyste à paroi mince contenant une seule couche de membrane, soit un oocyste à paroi épaisse contenant deux couches de membrane. Les oocystes à paroi épaisse sont résistants à l'environnement et sont libérés dans les fèces, transmettant l'infection d'un hôte à l'autre, tandis que les oocystes à paroi mince s'auto-infectent chez le même hôte pour maintenir le parasite dans le tractus gastro-intestinal, évitant ainsi la nécessité d'une nouvelle infection orale (Khan, Shaik, Grigg 2018).

C. La maladie : La cryptosporidiose chez les ruminants

a. Clinique du veau nouveau-né

La cryptosporidiose se retrouve dans les troupeaux laitiers et allaitants bovins. La prévalence de l'infection peut être élevée chez les jeunes veaux, en particulier dans les systèmes d'élevage intensif, avec des résultats cliniques variés, allant de la mort du veau à un retard de croissance et à des animaux ne présentant aucun signe clinique évident. La dose infectieuse minimale pour les veaux nouveau-nés est très faible : 17 oocystes suffisent à provoquer l'infection, et il existe une corrélation entre la quantité d'oocystes ingérés et la sévérité des signes cliniques (Innes et al. 2020).

Parmi les veaux infestés par *Cryptosporidium*, seuls certains individus vont présenter de la diarrhée. Les facteurs déclenchant des signes cliniques ne sont pas encore bien connus aujourd'hui (Olson et al. 2003).

C. parvum induit, au niveau de l'intestin la destruction des microvillosités et une atrophie villeuse plus ou moins importante. Cela entraîne un syndrome de malassimilation/malabsorption, un déséquilibre de la flore intestinale et de l'absorption/excrétion d'eau et donc, une diarrhée (Alzieu et al. 2012).

Les signes cliniques chez les veaux gravement infectés sont généralement des fèces jaunâtres, plus ou moins profuses et aqueuses, une réticence à s'alimenter, une déshydratation et, dans les cas graves, la mort. L'intestin met quelques semaines à se remettre de l'infection et

à retrouver sa capacité à absorber efficacement les nutriments. L'excrétion d'oocystes dans les fèces des veaux infectés peut être observée à partir du quatrième jour après l'infection, pendant 10 jours à 2 semaines, et peut se produire après l'arrêt de la diarrhée (Innes et al. 2020).

Dans le premier mois de vie du veau, on, peut observer des phases alternées de diarrhée et de rémission. Ce phénomène peut s'expliquer par la capacité d'auto-infection des oocystes de *Cryptosporidium* ainsi que par la mise en place d'une immunité progressive chez le veau (Alzieu et al. 2012).

La maladie peut également entraîner des répercussions à long terme sur la production du bétail. En effet des bovins infectés par *Cryptosporidium* et suivis de la naissance à 210 jours ont montré une corrélation entre l'infection et un gain de poids vif plus faible ainsi que de moins bonnes performances de production (Silva Abreu et al. 2019).

Bien que la morbidité de la cryptosporidiose soit souvent élevée, la mortalité varie selon les cheptels. On a notamment observé une augmentation de la mortalité lors de co-infections avec d'autres agents pathogènes tels que le rotavirus ou *E. coli* (Alzieu et al. 2012).

b. Epidémiologie

À l'échelle mondiale, *Cryptosporidium* est un parasite cosmopolite affectant un grand nombre d'espèces animales, dont l'homme et les principaux animaux d'élevage tels que : les bovins, les moutons, les chèvres, les porcs, les lapins, les chevaux, les ânes, les buffles d'eau, les chameaux et les volailles. Des *Cryptosporidium* spp. zoonotiques ont également été signalés chez des espèces sauvages, notamment les lapins, les cerfs, chez d'autres mammifères sauvages et chez les poissons (Innes et al. 2020).

i. La place de *Cryptosporidium* spp dans le monde

À ce jour, plus de 40 espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées dans le monde (Hatam-Nahavandi et al., 2019) et environ sept espèces et deux génotypes ont été identifiés chez les bovins. Le parasite, sous forme d'oocystes sporulés viables, peut être transmis par la voie fécale-orale d'un humain à un humain ou d'un animal à un animal (transmission anthroponotique) ou d'un animal à un humain (transmission zoonotique) par de l'eau ou des aliments contaminés. L'infection est autolimitée chez les hôtes immunocompétents, mais elle entraîne des diarrhées aiguës et chroniques potentiellement mortelles chez les jeunes animaux et les animaux immunodéprimés (Tarekegn, Tigabu, Dejene 2021).

Hatam-Nahavandi et al. a réalisé une méta-analyse de 429 études sur les infections à *Cryptosporidium* spp. chez les ongulés dans le monde entier sur les trente dernières années. L'analyse révèle que sur la population totale des 429 études, 18,9 % des ongulés étaient porteurs du parasite, la prévalence étant plus élevée chez les ongulés de l'ordre des Cetartiodactyla (bovin, cervidé, suidé, girafe etc.) que ceux de l'ordre des Perissodactyla (équidé, tapir, rhinocéros) (Hatam-Nahavandi et al. 2019).

Les deux espèces les plus rencontrées sont *C. parvum* (39,4 %) et *C. andersoni* (18,8 %). *C. parvum* est l'espèce la plus représentée à 54,1 % chez les bovins, à 42,1 % chez les caprins et 40,2 % chez les équins (Hatam-Nahavandi et al. 2019).

Des études ont indiqué que la prévalence de la cryptosporidiose varie de 6,25 à 39,65 % chez les bovins dans différentes parties du monde (Tarekegn, Tigabu, Dejene 2021). Même si *C. parvum* est l'espèce la plus identifiée chez les bovins, on retrouve trois autres espèces qui sont fréquemment retrouvées dans les cas de cryptosporidiose bovine : *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni*. Ces quatre espèces sont régulièrement décrites dans les études épidémiologiques (de différents pays) sur l'infection à *Cryptosporidium* chez les bovins (Hatam-Nahavandi et al. 2019).

Pour les animaux de rente, la prévalence de *Cryptosporidium* spp. est la plus élevée en Amérique et en Europe (Figure 8). On peut certainement attribuer cela au mode d'élevage de ces pays, où la production y est plus intensive. On observe effectivement qu'entre une population sauvage et une population domestiquée, la prévalence d'une même espèce de *Cryptosporidium* est plus élevée dans la population domestiquée. Cette observation renforce l'hypothèse qu'une forte densité animale associée à leur confinement à un seul milieu de vie facilitent la transmission du parasite (Hatam-Nahavandi et al. 2019).

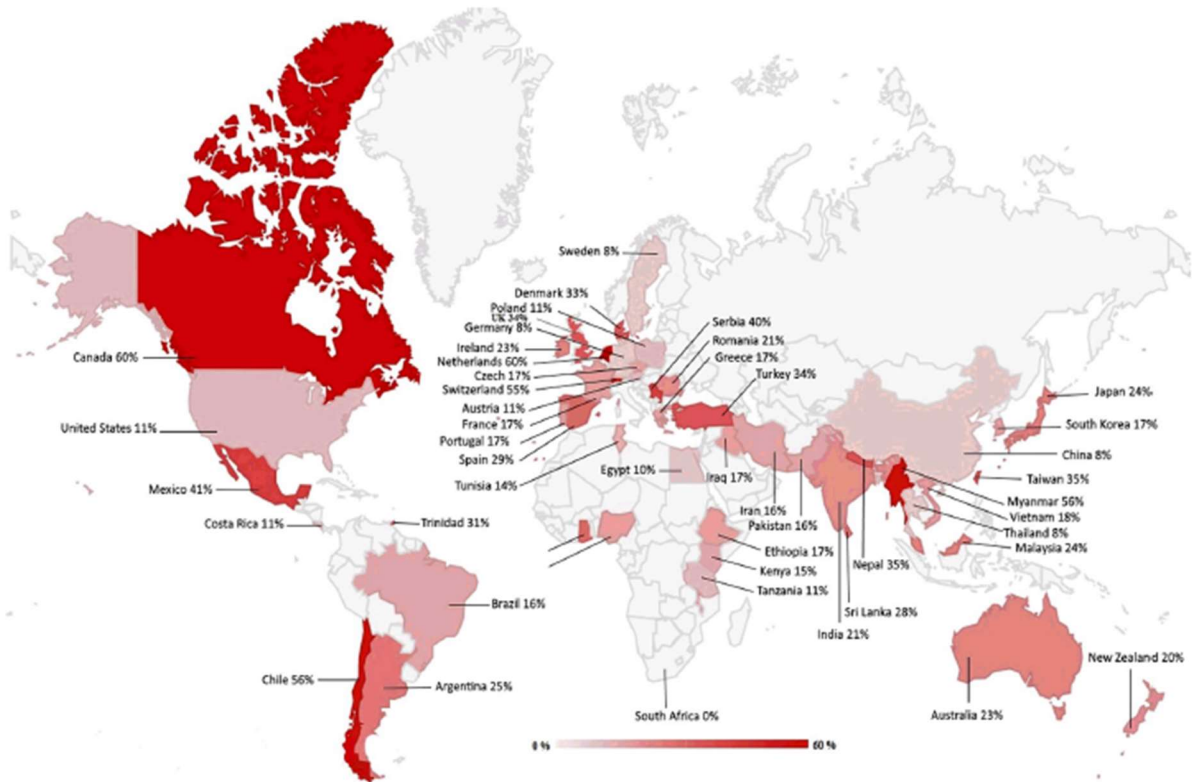


Figure 8 : Carte de la prévalence globale de *Cryptosporidium* spp. dans différentes régions géographiques du monde définies par observation microscopique chez les animaux de ferme (bovins comprenant les buffles, ovins, caprins, porcins, équins) (Hatam-Nahavandi et al., 2019)

Bien que de nombreuses études sur la cryptosporidiose chez les bovins aient été menées, la plupart d'entre elles ont porté sur des exploitations laitières, tandis que seul un petit nombre d'études se sont concentrées sur les bovins allaitants. Peu d'études ont utilisé des outils de diagnostic moléculaire pour identifier et différencier les espèces/génotypes infectant les bovins allaitants (Abeywardena, Jex, Gasser 2015). Des études menées au Canada et aux États-Unis ont rapporté des prévalences d'infection par *Cryptosporidium* chez les bovins de boucherie de 7,1 à 43 %. Très peu d'informations sont disponibles sur la cryptosporidiose chez les bovins à viande pour les autres pays, en particulier pour les pays en développement (Abeywardena, Jex, Gasser 2015).

En outre, l'épidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose chez les bovins des pays développés pourrait être différente de celle des pays en développement, car les exploitations bovines des pays développés sont gérées de manière intensive, alors que la plupart des exploitations des pays en développement sont extensives ou semi-extensives. Les fermes familiales de petite taille (<10 animaux) sont courantes dans les pays en développement, notamment en Asie. Les bovins des pays en développement peuvent avoir un contact plus étroit avec les humains que ceux des pays développés. Par conséquent, la dynamique de transmission

de la cryptosporidiose pourrait ne pas être la même dans les pays développés et dans les pays en développement (Abeywardena, Jex, Gasser 2015).

Le buffle d'eau (*B. bubalis*) est l'un des animaux d'élevage les plus importants dans de nombreuses régions du monde en développement. La population mondiale de buffles d'eau était estimée à 195 millions en 2011, étant principalement répartie en Asie, dans certaines régions méditerranéennes et dans les pays d'Amérique latine. Les buffles se complaisent généralement dans les rivières, les ruisseaux et autres sources d'eau. Les excréments de buffle sont utilisés comme engrais pour les cultures. Dans certains pays, le fumier est également utilisé pour tapisser les sols et les murs des maisons, ce qui représente un risque de transmission à l'homme. La mesure dans laquelle les buffles d'eau contribuent à la transmission zoonotique de ces protistes est largement inconnue (Abeywardena, Jex, Gasser 2015). *Cryptosporidium* a été détecté dans les fèces de buffles d'eau dans un certain nombre d'études : en Égypte, en Inde, en Italie, au Népal, au Pakistan, aux Philippines et en Espagne. Les études sur l'infection par *Cryptosporidium* chez les buffles d'eau sont limitées, et seul un petit nombre d'entre elles utilisent des outils moléculaires. Ces études ont rapporté un génotype unique de *Cryptosporidium*, qui est étroitement lié à *C. ryanae*, dans la plupart des échantillons provenant de buffles. Des résultats récents montrent que les génotypes de *Cryptosporidium* trouvés chez les buffles d'eau sont clairement différents de ceux trouvés chez les bovins. Parmi les deux génotypes (1 et 2) identifiés chez les buffles d'eau de Victoria, le génotype 1 était identique à ceux précédemment rapportés pour les isolats de buffles d'eau, alors que le génotype 2 n'avait pas été rapporté précédemment. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre le statut taxonomique, la spécificité d'hôte et la virulence de ces génotypes trouvés chez les buffles d'eau (Abeywardena, Jex, Gasser 2015).

Dans les élevages traditionnels (avec accès permanent à l'extérieur) en Turquie (10 élevages inclus dans l'étude), la seule espèce de *Cryptosporidium* identifiée chez des veaux de 1 à 4 semaines d'âge était *C. parvum*, dont les sous-types étaient IIAA13G2R1, IIAA18G1 et IIAA29G1b (Taylan-Ozkan et al. 2016).

En Nouvelle-Zélande, à l'aide d'une approche basée sur la PCR, une étude a cherché à savoir si les veaux laitiers de la région de Canterbury de l'île du Sud de la Nouvelle-Zélande étaient porteurs de génotypes de *Cryptosporidium* connus pour infecter les humains. Les résultats ont révélé la présence d'espèces/génotypes potentiellement zoonotiques de ce parasite. Un résultat important a été la mise en évidence de *C. hominis* dans les échantillons fécaux

prélevés sur des veaux pré et post-sevrés. Le *Cryptosporidium* hominis trouvé représentait le sous-genre IbA10G2R2, sous-genre le plus largement distribué de *Cryptosporidium* infectant les humains dans le monde. Il faut cependant remarquer que les méthodes moléculaires choisies pour cette étude (basées sur la détection et la caractérisation du gène gp60) n'ont pas utilisé d'amorces capables de détecter d'autres espèces et génotypes communs de *Cryptosporidium* connus pour infecter couramment les bovins (par exemple *C. andersoni*, *C. bovis* et *C. ryanae*) (Abeywardena, Jex, Gasser 2015).

En Australie, une enquête épidémiologique moléculaire sur *Cryptosporidium* a été menée sur les veaux laitiers et les veaux de boucherie de cinq fermes situées dans une zone de captage d'eau potable ouverte dans l'État de Victoria. Les résultats de cette étude ont montré qu'une proportion considérable de bovins, notamment de veaux laitiers, étaient porteurs de *C. parvum*. Ces résultats sont en accord avec les enquêtes précédentes menées dans d'autres régions d'Australasie. En plus de *C. parvum*, *C. bovis*, et *C. ryanae*, un nouveau génotype de *Cryptosporidium* a été détecté. Sur la base de l'analyse des séquences du gène gp60, tous les isolats de *C. parvum* provenant de bovins victoriens ont été identifiés comme étant de génotype IIa et de sous-génotype A18G3R1. Des études antérieures menées en Australie ont signalé que *C. parvum* IIaA18G3R1 était un sous-génotype commun chez les humains et les bovins. Curieusement, bien que *C. parvum* IIaA18G3R1 ait été signalé avec une prévalence élevée en Australie, il est rarement signalé ailleurs dans le monde (Abeywardena, Jex, Gasser 2015).

Alors que des études précédentes au Sri Lanka ont établi la présence de la cryptosporidiose chez les humains et les animaux, une étude a documenté pour la première fois les espèces et les génotypes de *Cryptosporidium* chez les bovins domestiques dans ce pays en utilisant des outils moléculaires. Il est intéressant de noter que huit nouveaux génotypes de *Cryptosporidium* ont été identifiés. L'absence de *C. parvum* dans tous les échantillons prélevés sur des veaux âgés de 1 à 3 mois était inattendue, car il s'agit de l'espèce de *Cryptosporidium* la plus fréquemment signalée chez les veaux pré-sevrés dans le monde. L'identification de nombreux nouveaux génotypes et l'absence de *C. parvum* suggèrent que l'épidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose au Sri Lanka pourrait être distincte de celle de l'Australasie et d'autres régions du monde. Le génotype le plus courant retrouvé chez les veaux laitiers du Sri Lanka, présentait une homologie de 99 % avec *C. bovis* (Abeywardena, Jex, Gasser 2015). Il est intéressant de noter que d'autres études menées en Chine, en Inde, en Géorgie, au Nigéria et en Suède ont également rapporté une situation similaire, où *C. bovis* a été l'espèce prédominante chez les veaux âgés de 1 à 60 jours, au lieu de *C. parvum*. Par conséquent, les preuves fournies dans cette revue suggèrent que la distribution des espèces de *Cryptosporidium*

en fonction de l'âge chez les bovins n'est pas la même dans tous les pays ou régions géographiques (Abeywardena, Jex, Gasser 2015).

Globalement, *Cryptosporidium* a été détecté dans une proportion considérable (8,3 à 62%) chez les bovins et buffles d'eau en Australie, en Nouvelle-Zélande et au Sri Lanka (Abeywardena, Jex, Gasser 2015).

Les informations moléculaires concernant la diversité et la fréquence des espèces/génotypes de *Cryptosporidium*, chez les bovins et les humains, circulant en Afrique, et en particulier en Ethiopie, sont rares. Par conséquent, Tarekegn et al. ont réalisé une revue systématique et une méta-analyse permettant d'estimer la prévalence et d'évaluer les facteurs de risque de l'infection à *Cryptosporidium* chez les bovins et les humains sur les 20 dernières années. A ce jour, sept études ont été menées pour identifier et sous-typier le parasite infectant les bovins et les humains. Ainsi, 10 espèces de *Cryptosporidium* ont été documentées dans le cadre d'études menées sur des bovins et des humains. Les espèces/génotypes rapportés chez les bovins étaient *Cryptosporidium andersoni*, *C. parvum*, *C. bovis* et *C. ryanae*. Parmi ces espèces, *C. andersoni* et *C. parvum* étaient les espèces dominantes et les plus fréquemment signalées comme responsables des cas chez les bovins. Les rapports utilisant l'analyse des séquences des gènes gp60 ou ssu-rRNA (18S rRNA) ont révélé une grande diversité génétique de *C. parvum* et *C. hominis*. Les sous-types de *C. parvum* provenant des bovins comprennent les sous-types IIa et II d des bovins. Mais aucune étude sur les autres sous-génotypes de *Cryptosporidium* n'a été menée dans la population bovine (Tarekegn, Tigabu, Dejene 2021). La prévalence pondérée de l'infection par *Cryptosporidium* a été estimée à 16,2 % chez les bovins dans cette méta-analyse. Cela suggère la probabilité d'un risque élevé de cryptosporidiose clinique chez les jeunes bovins et les bovins immunodéficients en Ethiopie. Toutefois, une prévalence plus élevée (28 %) de la cryptosporidiose a été signalée dans une autre étude en Ethiopie. D'autres études ont également documenté une prévalence globale similaire (26,1 %) de l'infection par *Cryptosporidium* chez les bovins du Nigeria (Tarekegn, Tigabu, Dejene 2021).

Des fèces ont été prélevées aléatoirement, sur 460 jeunes bovins dans 10 élevages d'Algérie, afin de rechercher *Cryptosporidium*. Les résultats de ces prélèvements ont montré la présence des quatre espèces de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni*) chez les bovins âgés de 2 jours à 18 mois. *C. parvum* a été retrouvé presque exclusivement chez les veaux de moins de 30 jours d'âge, contrairement à *C. bovis* qui a été retrouvé en général chez les veaux de plus de 15 jours d'âge. *C. ryanae* et *C. andersoni* n'ont

été retrouvés que chez des bovins (veaux et génisses) asymptomatiques. Le sous-type de *C. parvum* identifié était IIaA16G2R1 (Ouakli et al. 2018).

Une étude aux Etats-Unis, a étudié 40 veaux diarrhéiques non-sevrés (de 5 à 20 jours d'âge) de 7 élevages différents. Les analyses des échantillons de fèces ont permis d'identifier uniquement l'espèce *C. parvum* et le sous-type IIaA15G2R1 (Gharieb et al. 2019).

Une étude a été menée au Brésil afin d'étudier la présence de *Cryptosporidium* spp. et son impact sur l'évolution du poids de l'animal et la consistance fécale chez les bovins croisés Néllore (race bovine brésilienne). Des oocystes de *Cryptosporidium* spp. ont été trouvés dans 16,43 % des 420 échantillons de fèces de bovins prélevés, et ces animaux parasités présentaient un gain de poids moyen (4,76 kg) inférieur à celui des individus non parasités (10,58 kg). La présence de ce protozoaire a été détectée dans 81,78% des fèces diarrhéiques et pâteuses, indiquant une association du parasite avec des épisodes diarrhéiques persistants. Parmi les bovins examinés dans cette étude, une occurrence plus élevée de *Cryptosporidium* spp. a été observée chez les veaux maigres diarrhéiques, qui présentaient une prise de poids plus faible et une mauvaise performance productive (Silva Abreu et al. 2019).

Une étude, réalisée dans un seul et même élevage, en Ecosse, a identifié *C. parvum* comme étant l'agent responsable de la majorité des infections à *Cryptosporidium* chez les veaux de moins de 6 semaines ainsi que chez les veaux de 6mois, *C. bovis* et *C. ryanae* étant responsables en majorité chez les veaux de plus de 4 semaines de vie et enfin *C. andersoni* chez les adultes. Les deux sous-types de *C. parvum* identifiés étaient IIaA15G2R1 et IIaA19G2R1. La première année, des fèces ont été collectées sur 25 veaux de leurs naissances à 1 an de vie. La deuxième année, des fèces ont été collectées sur 30 veaux de leurs naissances à 6 mois de vie ainsi que sur leurs mères. Les prélèvements ont eu lieu 3 fois par semaine sur les veaux de leur naissance jusqu'à leur 6 mois puis, 1 fois à 9 mois et 12 mois de vie. Les prélèvements sur les mères ont été réalisés avant le vêlage (Thomson et al. 2019). Les chercheurs ont noté que l'on retrouvait une prévalence plus élevée chez les jeunes veaux que chez les adultes.

En Suède des prélèvements ont été effectués dans 30 élevages, chez tous les veaux de moins de 3mois (332 veaux au total). Des oocystes de *Cryptosporidium* ont été retrouvés dans les fèces des veaux allaitants de 1 à 2 jours de vie. *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni* ont été identifiés, sans pouvoir déterminer une corrélation entre l'âge de l'hôte et l'espèce identifiée. En effet, *C. bovis* a été observé chez un veau de 1 jour, *C. parvum* chez un

veau de 4 jours et *C. ryanae* chez un veau de 7 jours. Les deux sous-types de *C. parvum* identifiés étaient IIAA16G1R1 et IIDA27G1 (BJÖRKMAN et al. 2015).

En Allemagne, une étude a été réalisée dans le but de connaître la distribution des sous-types de *C. parvum* chez les jeunes veaux. L'étude a été réalisée dans 58 élevages, où entre 5 et 18 veaux (ayant entre 1 et 28 jours de vie) ont été prélevés de façon aléatoire trois fois à une semaine d'intervalle. Tous les sous-types identifiés appartenaient au groupe IIA et celui qui a été le plus observé (dans 66 % des élevages testés) était le IIAA15G2R1. Suivi par le sous-type IIAA16G3R1, présent dans 13 % des élevages (Holzhausen et al. 2019).

En Estonie, 486 veaux de 53 élevages différents ont été étudiés. Dans chaque élevage, un vétérinaire a prélevé les fèces de maximum 10 veaux de moins de 2 mois d'âge. 23 % des veaux ont excrétés *Cryptosporidium* spp., réparties sur 66 % des élevages participants. Trois espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées, dont la principale était *C. parvum*. Les deux autres étaient *C. bovis* et *C. ryanae*. Le sous-typage de *C. parvum*, basé sur le séquençage de gp60, a permis de trouver dix sous-types différents, dont majoritairement IIAA18G1R1, indiquant qu'il existe une grande diversité génétique (Santoro et al. 2019).

La cryptosporidiose bovine est une maladie que l'on retrouve mondialement. Elle présente une grande hétérogénéité dans sa description et sa caractérisation, particulièrement due à une diversité génétique au sein des *Cryptosporidium* spp. Cette diversité entraîne une distribution particulière de la maladie selon la zone géographique, les populations, l'industrialisation du pays, ou même le mode d'élevage.

C. parvum est l'espèce de *Cryptosporidium* la plus identifiée chez les veaux nouveau-nés. Les études ont permis d'identifier de nombreux sous-types chez les bovins, où les sous-types zoonotiques IIA et IID font parties des plus communs. Dans les pays industrialisés, c'est le sous-type IIAA15G2R1 qui est majoritairement retrouvé (Feng, Ryan, Xiao 2018).

ii. La place de *Cryptosporidium* spp en France

Deux enquêtes ont été menées par Lefay et al., en France, en 2000, pour estimer la prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* chez les veaux en utilisant un test ELISA qualitatif pour la détection des coproantigènes et des oocystes de *Cryptosporidium*. La première enquête a porté sur des veaux âgés de 4 à 12 jours dans six centres d'allotements de veaux laitiers, recueillant des veaux de sept régions différentes (Aquitaine, Bretagne, Franche Comté, Lorraine, Normandie, Nord, Pays de Loire). Pour chaque région, 20 veaux ont été sélectionnés

aléatoirement chaque mois pendant un an (d'octobre 1995 à septembre 1996). La prévalence de l'infection à *Cryptosporidium* était de 17,9% en moyenne parmi les veaux sélectionnés (seulement 5,3% avaient de la diarrhée). Cette prévalence varie entre 13,3% et 25,3% selon les régions d'origine des veaux. Cette première partie de l'étude reflète la prévalence chez les veaux asymptomatiques en France. La seconde enquête réalisée entre novembre 1995 et mai 1996 a porté sur des veaux de 4 à 21 jours examinés par des vétérinaires praticiens qui ont sélectionné 189 élevages de type laitier ou allaitant dans leurs clientèles (incluant les départements : Allier, Cantal, Creuse, Doubs, Ille-et-Vilaine, Maine-et-Loire, Manche, Pas-de-Calais, Saône et-Loire, Vendée). Des cryptosporidies ont été détectées dans 55,6% de ces exploitations. Parmi les 440 veaux examinés (dont 90,5% cliniquement atteint de diarrhée), des cryptosporidies ont été trouvées chez 191 animaux, soit une prévalence de 43,4%. Celle-ci variant entre 17,9% et 70,4% selon les régions, donnant ainsi une idée de la prévalence chez les veaux symptomatiques. Cette étude reflète bien l'endémicité de la cryptosporidiose en France (Lefay et al. 2000).

Une étude menée par Follet et al. en 2011 fut la première à se servir de la biologie moléculaire pour étudier la cryptosporidiose en Bretagne. Des fèces ont été prélevées dans quinze élevages sans antécédents connus de cryptosporidiose. Ces prélèvements ont eu lieu à 5, 15 puis 22 semaines de vie afin d'observer l'évolution de l'infection au fil du temps (Follet et al. 2011). L'étude montre que sur les quinze élevages, tous étaient contaminés par *Cryptosporidium*, soutenant l'hypothèse que la cryptosporidiose est une maladie endémique. Sur les 142 animaux testés, 70,4 % ont été retrouvés positifs à *Cryptosporidium* au moins une fois. L'étude montre également une corrélation entre l'âge de l'hôte et l'infection à différentes espèces. En effet, *C. parvum* a été retrouvé à 86,7 % chez les veaux de 5 semaines, *C. ryanae* à 4,4 % et *C. bovis* à 1,5 %. Par la suite, la proportion de *C. parvum* a chuté à 1,7 % chez les veaux de 15 semaines alors que les prévalences de *C. bovis* et *C. ryanae* étaient similaires à 15 et 22 semaines d'âge. On remarque également que le sous-typage de *C. parvum* a révélé la présence de 6 sous-types IIa, dont 74,5 % étaient le sous-type IIaA15G2R1, devant IIaA17G1R1 et IIaA16G3R1 (Follet et al. 2011). On remarque donc que *C. parvum* infeste principalement les veaux nouveau-nés et que le sous-type IIaA15G2R1 est le plus souvent incriminé (Follet et al. 2011).

Une autre étude menée par Rieux et al. en 2013 a eu des résultats analogues. Des échantillons de fèces ont été prélevés une fois par semaine sur 18 velles de la naissance à 10,5 mois de vie dans un élevage allaitant du département des Deux-Sèvres (Rieux et al. 2013). Sur cette période tous les animaux ont été testés positifs à *Cryptosporidium* au moins une fois. Les

chercheurs ont retrouvé les mêmes espèces que dans l'étude de Follet et al. : *C. parvum*, *C. bovis* et *C. ryanae*. Cependant, ils n'ont identifié qu'un seul sous-type de *C. parvum* : IIaA15G2R1. Ils ont également observé une apparition des différentes espèces plus rapprochée dans le temps. En effet, les chercheurs ont observé des oocystes de *C. parvum* à 7 jours d'âge, de *C. bovis* à 11 jours d'âge et de *C. ryanae* à 19 jours d'âge. Cela suggère que la relation entre l'âge de l'hôte et l'excrétion d'une certaine espèce de *Cryptosporidium* n'est pas encore totalement comprise à ce jour. Une des hypothèses émises pour expliquer ces résultats serait le facteur mode d'élevage : les élevages allaitants ne séparent pas les veaux et donc des animaux de tranches d'âges variés sont en contact. Ainsi les espèces de *Cryptosporidium* plus communément observées chez les veaux plus âgés se retrouvent plus aisément chez les plus jeunes veaux (Rieux et al. 2013).

Le travail de Rieux et al. dans les des Deux-Sèvres c'est poursuivi dans le même élevage, durant 3 ans au total, et a été publié en 2014. Permettant ainsi aux chercheurs de suivre l'évolution de *Cryptosporidium* au fil des ans chez les veaux non-sevrés. La saison de vêlage était définie entre septembre et décembre, les veaux et les mères vivant tous ensemble en bâtiment jusqu'en février. Les fèces de chaque veau ont ainsi été récoltées de façon hebdomadaire de leur naissance à 1 mois de vie (Rieux et al. 2014). L'observation majeure de cette étude fut la variabilité des espèces circulantes (*Cryptosporidium* : *C. parvum*, *C. bovis* et *C. ryanae*) d'une année sur l'autre. La première année, *C. bovis* fut l'espèce majoritaire identifiée (avec un seul échantillon positif à *C. parvum*) tandis que *C. parvum* fut majoritaire sur la troisième année (avec aucun échantillon positif à *C. bovis*. *C. ryanae* chez des veaux âgés de 18 à 30 jours de vie) (Rieux et al. 2014). La sévérité des signes cliniques a également fluctué d'une année sur l'autre avec aucun signe clinique observé la première année et 80% et 90% des veaux exprimant une diarrhée transitoire sur la deuxième et troisième année respectivement. Les trois espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées dans les prélèvements qu'ils soient diarrhéiques ou non. Cependant, *C. parvum* fut le pathogène majoritaire au sein des prélèvements diarrhéiques (Rieux et al. 2014).

Une autre étude réalisée en Normandie par Delafosse et al. a cherché à évaluer la prévalence et les facteurs de risque de cryptosporidiose lors de diarrhées néonatales en élevage laitier. 968 veaux, répartis dans 97 élevages, ont ainsi été prélevés en fèces entre 7 jours et 21 jours de vie. Des oocystes ont été retrouvés dans 41,5 % des prélèvements avec seulement 7 élevages totalement négatifs. Cela montre que *C. parvum* est très représenté chez les veaux de moins de 21 jours en Normandie. De plus, l'infection a été associée à une plus grande incidence

d'apparition de diarrhée et à l'augmentation du risque de mortalité chez le jeune veau (Delafosse et al. 2015).

La cryptosporidiose est donc présente sur l'ensemble du territoire Français depuis de nombreuses années et peut être qualifiée d'endémique. Chez le jeune veau, l'espèce majoritairement identifiée est *C. parvum* mais il n'est pas étonnant d'identifier d'autres espèces comme que *C. bovis* ou *C. ryanae*. Parmi tous les sous-types de *C. parvum*, le plus généralement retrouvé est le sous-type IIaA15G2R1.

iii. Transmission et risque zoonotique

1. La transmission du parasite

La surveillance de *Cryptosporidium* est difficile du fait de la pluralité des sources de contamination. En effet la transmission la plus connue et la plus commune pour ce parasite est par la voie oro-fécale, qu'elle soit zoonotique, anthroponotique ou enzootique. On retrouve également une possible transmission mécanique (indirecte), via les mouches, les chiens, le bétail, ou par la contamination de la nourriture ou de l'eau (*Figure 9*) pour les humains. Pour les bovins la transmission indirecte peut également avoir lieu notamment par la contamination de l'eau. Ainsi, le risque d'infection pour l'Homme est plus important en milieu rural par rapport au milieu urbain dû à une plus grande proximité de réservoirs (animaux sauvages et domestiques) et une prise en charge sanitaire différente (Thompson, Koh, Clode 2016).



Figure 9 : Représentation graphique des principaux modes de transmission des *Cryptosporidium* spp zoonotiques entre les différentes espèces impliquées et dans l'environnement (Innes et al., 2020)

L'estimation de l'excrétion annuelle d'oocystes de *Cryptosporidium* spp. par le bétail au niveau mondial est d'environ $3,2 \times 10^{23}$ oocystes par an, la majorité étant excrétée par les bovins. Les bovins jouent donc un rôle non négligeable dans la dissémination et la transmission de *Cryptosporidium* dans le monde (Hatam-Nahavandi et al. 2019).

Les veaux infectés sont la source principale de dissémination de *C. parvum* dans l'environnement et peuvent être à l'origine d'une transmission veau – homme pour les types zoonotiques. En effet le pic d'excrétion a été systématiquement observé par Rieux et al. dans la même tranche d'âge (entre la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine de vie) avec une excrétion comprise entre 100 et $1,7 \times 10^7$ oocystes/g de fèces (Rieux et al. 2014).

Les animaux adultes ont généralement une infection asymptomatique associée à une excrétion d'oocystes à bas bruit. Ils n'ont qu'un rôle faible dans la dissémination du parasite. Cependant, au sein d'un cheptel, ils jouent le rôle de réservoir en étant des porteurs sains de *Cryptosporidium* et ont donc la possibilité d'être à l'origine de réinfections (Rieux 2013). Et

cela même si le degré d'intensité de l'excrétion des oocystes est nettement plus faible chez les adultes que chez les jeunes bovins (Castro-Hermida et al. 2007).

Une des voies possibles de transmission du parasite aux veaux serait de la mère au veau lors de la mise-bas. Thomson et al. ont étudié cette possibilité et ne sont finalement pas en faveur de cette hypothèse. En effet, le sous-type identifié chez les veaux de moins de 6 semaines était le sous-type IIAA19G2R1 et celui des veaux de 6 mois était le IIAA15G2R1. Les bovins adultes présentaient quatre sous-types, dont les deux précédemment identifiés. Cependant, le sous-type IIAA15G2R1 était majoritaire chez les adultes. Ainsi, la probabilité pour que les adultes soit la source de contamination à *Cryptosporidium* des veaux nouveau-nés était très faible (Thomson et al. 2019).

Des études récentes ont permis d'observer la présence de *C. parvum* chez des animaux sauvages, tels que le cheval mustang (*Equus ferus caballus*), le chevreuil (*Capreolus capreolus*), le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) ou encore le sanglier (*Sus scrofa scrofa*). Bien que leur importance dans le cycle de *C. parvum* ne soit pas encore bien définie, ils pourraient jouer un rôle dans la dissémination des oocystes de *Cryptosporidium* (Hatam-Nahavandi et al. 2019).

2. Les risques zoonotiques

La cryptosporidiose est une maladie diarrhéique importante chez l'homme et l'animal dans le monde entier. Elle fut découverte chez la souris en 1912, et ce n'est qu'en 1971 que Panciera et al. décrivent le premier cas de cryptosporidiose bovine. Les jeunes enfants et les personnes dont le système immunitaire est compromis sont très vulnérables à la maladie et l'importance de *Cryptosporidium* dans la santé humaine a été reconnue pour la première fois pendant l'épidémie de SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée) dans les années 1980. Entre 2007 et 2017, la prévalence mondiale de *Cryptosporidium* chez les patients atteints du VIH (Virus de l'Immunodéficiency Humaine) était de 10,9 %. Le diagnostic et le traitement de la cryptosporidiose sont ainsi devenus primordiaux pour les personnes co-infectées (Innes et al. 2020). En avril 1993 un deuxième événement majeur a mis en lumière l'importance de *Cryptosporidium* : le parasite est identifié en tant que source de la plus grande épidémie d'origine hydrique dans l'histoire des Etats-Unis. En effet 403 000 personnes habitant à Milwaukee, Wisconsin, furent touchés par la cryptosporidiose (Thompson, Armson, Ryan 2003). La mortalité associée à la cryptosporidiose a alors fortement augmenté lors de cet événement. Elle est passée de 2 personnes dans les deux ans avant l'événement à 54 personnes deux ans plus tard, dont 85 % étaient des personnes immunodéprimées (Hoxie et al. 1997).

Certaines populations sont particulièrement vulnérables à l'infection par *Cryptosporidium*, et le parasite a été inclus dans la liste des maladies négligées de l'Organisation mondiale de la santé en 2004 (Innes et al. 2020). Une étude épidémiologique à grande échelle portant sur 22 500 enfants en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est révèle ainsi que *Cryptosporidium* est une cause majeure de diarrhée sévère chez les très jeunes enfants et est le seul pathogène gastro-intestinal présentant un risque significatif de décès chez les enfants âgés de 12 à 23 mois. *Cryptosporidium* est également reconnu comme un important agent pathogène d'origine alimentaire, puisqu'il est responsable de plus de 8 millions de cas de maladies d'origine alimentaire par an (Innes et al. 2020).

Les études sur l'impact des maladies, axées sur les affections aiguës, estiment à 4,2 millions le nombre d'années de vie perdues chez les enfants de moins de 5 ans à cause de la cryptosporidiose, avec des séquelles à plus long terme, notamment des retards de croissance et des déficiences cognitives. Des études sur l'impact de la maladie dans les pays à revenu élevé ont révélé des répercussions à plus long terme après une infection aiguë, notamment des douleurs abdominales persistantes, des myalgies/arthralgies et de la fatigue, le syndrome du côlon irritable, et une étude récente a montré une forte association entre l'infection par *Cryptosporidium* et le cancer du côlon chez l'homme (Innes et al. 2020).

La cryptosporidiose chez les humains est généralement causée par certains sous-types de *C. parvum*, ou par l'espèce *C. hominis* qui est spécifique à l'homme. Ces deux catégories rassemblent plus de 90 % des cas humains dans le monde entier. Par exemple, 96 % des cas de cryptosporidiose humaine au Royaume-Uni sont dus à ces deux catégories (Thomson et al. 2017). Cependant, *C. bovis* et *C. andersoni*, deux espèces retrouvées régulièrement chez les bovins, ont également été identifiées dans quelques cas humains. *C. bovis* a été retrouvé dans deux cas asymptomatiques et un cas symptomatique (Ryan, Fayer, Xiao 2014). Dans l'étude de Liu et al., *C. andersoni* a été identifié chez 32 patients atteints de diarrhée sur 252 en Chine (Liu et al. 2014). Et bien que la plupart des sous-types de *C. parvum* soient zoonotiques, une sous-espèce adaptée à l'homme a été identifiée et proposée comme *C. parvum anthroponosum* (Innes et al. 2020).

Les personnes peuvent être infectées directement par l'ingestion d'oocystes infectieux par la voie fécale-orale (Innes et al. 2020). La dose infectieuse pour un homme est comprise entre 10 et plus de 1000 oocystes (Ryan, Fayer, Xiao 2014), sachant que les animaux infectés peuvent excréter jusqu'à $1,1 \times 10^8$ opg (Oocystes par gramme) lors du pic d'excrétion (Hatam-Nahavandi et al. 2019). La contamination peut avoir lieu dans le cadre professionnel, par

contact avec des animaux infectés, ou indirectement par la consommation d'eau potable ou d'aliments contaminés. Les données sur l'origine de la contamination sont rares pour *Cryptosporidium*. Une étude menée au Canada a recherché l'origine de cas sporadiques de cryptosporidiose à partir de données sur l'exposition, et a constaté que l'eau était la source probable d'infection la plus souvent signalée (48 % des cas), suivie par le contact avec le bétail (21 %), le contact de personne à personne (15 %), la transmission par les aliments (8 %) et le contact avec les animaux domestiques (8 %). Des études plus récentes menées par des experts confirment généralement cet ordre (Innes et al. 2020).

La contamination de l'environnement par les oocystes de *Cryptosporidium* est répandue dans le monde entier et il a été suggéré que *Cryptosporidium* constitue la plus grande menace pathogène pour l'industrie de l'eau. Sur 199 foyers documentés de maladies parasitaires protozoaires humaines dues à une contamination de l'eau au cours de la période 2004 à 2010, *Cryptosporidium* spp. représentait la majorité des foyers. La manière dont les oocystes atteignent les cours d'eau n'est pas claire, car le trajet des oocystes des matières fécales de l'hôte vers les cours d'eau en passant par l'environnement n'est pas bien compris. La plupart des scientifiques et des experts de l'industrie de l'eau considèrent que ce transfert est principalement dû à l'écoulement de surface, en particulier en période de fortes pluies ou autour d'événements pluvieux intenses. L'effet du changement climatique (qui devrait augmenter les précipitations hivernales et les événements de précipitations extrêmes en été) sur la charge en agents pathogènes des eaux de surface a récemment été étudié, mais il devrait avoir un impact modéré sur le risque pour la santé publique, d'après des modèles d'analyse des charges en agents pathogènes des lieux de captations (Innes et al. 2020). Comme les pâturages pour le bétail entourent fréquemment les réservoirs destinés en fin de compte à l'eau potable humaine, cela peut poser des problèmes aux fournisseurs d'eau.

Les épidémies de cryptosporidiose associées à des approvisionnements en eau contaminés peuvent ainsi entraîner des répercussions économiques et sanitaires importantes. La grande épidémie d'origine hydrique du Wisconsin a touché 403 000 personnes et son coût a été estimé à 96,2 millions de dollars USD. En Suède, on a estimé que 50 000 jours de congé de maladie ont été attribués à la suite d'une épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique où la prévalence était de 45 % sur 60 000 résidents. La détection d'oocystes de *Cryptosporidium* dans les approvisionnements publics en eau entraîne souvent la condamnation des approvisionnements, des avis publics invitant à faire bouillir l'eau et la fourniture d'eau en bouteille. Lors d'une récente épidémie d'origine hydrique en Irlande, un avis d'ébullition de l'eau

a été émis pendant 158 jours, touchant plus de 120 432 personnes et coûtant environ 19 millions d'euros (Innes et al. 2020).

Des facteurs de risque zoonotiques généraux, sociaux et économiques, ont également été identifiés pour la cryptosporidiose humaine. *C. parvum* était plus fréquent dans les zones à faible densité de population humaine, où le rapport entre le nombre de fermes et le nombre d'habitants est plus élevé, où le rapport entre le nombre d'approvisionnements en eau privés et le nombre d'habitants est plus élevé, et dans les zones à forte densité de ruminants. En Angleterre et au Pays de Galles, les infections à *C. parvum* ont été liées au fait de vivre dans une zone où l'on estime que la charge de *Cryptosporidium* présente au sol due à l'étalement de fumier est élevée (Innes et al. 2020). L'analyse géographique indique que les espèces adaptées à l'homme (*C. hominis*, certains sous-types de *C. parvum*) sont relativement plus répandues dans les pays pauvres en ressources, alors que *C. parvum* zoonotique domine en Amérique du Nord, en Europe, en Australie et dans certaines parties du Moyen-Orient (Innes et al. 2020). Dans les pays développés, la plupart des infections à *C. parvum* sont causées par le sous-type IIa, et particulièrement IIaA15G2R1. Dans les pays en voie de développement, les infections à *C. parvum* sont généralement dues au sous-type anthroponotique IIc et quelques sous-types adaptés aux humains IIe et IIm. Au Moyen-Orient, les sous-types IIa et IID sont trouvés communément chez les hommes. Pour le sous-type IID, il est généralement absent dans la population Européenne ou Australienne et il n'est presque jamais trouvé aux Etats-Unis (Feng, Ryan, Xiao 2018).

La transmission varie selon les saisons ; dans la plupart des pays européens, les cas de cryptosporidiose sont principalement signalés à la fin de l'été et en automne (août-octobre), certains pays présentant également un pic moins important au printemps. Les épidémies et l'épidémiologie analytique moléculaire ont démontré que le pic de printemps est principalement attribuable à *C. parvum* et peut être lié aux périodes d'agnelage et de vêlage, tandis que le pic d'été/automne est principalement dû à *C. hominis* et est associé aux piscines et aux voyages à l'étranger (Innes et al. 2020).

Actuellement, le typage de *Cryptosporidium* est utilisé pour confirmer les épisodes zoonotiques. En Nouvelle-Zélande, des étudiants vétérinaires de l'université de Massey ont été en contact avec des veaux en diarrhée, dont certains avaient la cryptosporidiose. Les recherches ont montré que les étudiants ont été infectés par *C. parvum* IIaA18G3R1. Il semblerait que les étudiants de l'université soient régulièrement infectés par ce parasite, coïncidant avec la période de vêlage, malgré une sensibilisation aux zoonoses et des mesures d'hygiène augmentées (Benschop et al. 2017).

Un cas similaire a été observé chez les visiteurs de deux fermes en Suède, où des cas de cryptosporidioses humaines ont fait suite à un contact avec des veaux. Le typage de *C. parvum* a permis de créer le lien entre la source du parasite : les veaux, et l'émergence de la maladie chez les hommes. En effet, dans le premier élevage, les veaux étaient positifs à *C. parvum* IIaA16G1R1b et seulement ce pathogène a été retrouvé chez les visiteurs associés. Le même lien a pu être réalisé dans le second élevage, mais avec *C. parvum* IIaA18G1R1b (Alsmark et al. 2018).

c. Diagnostic : les techniques de détection et d'identification

L'identification de *Cryptosporidium* ainsi que la caractérisation génétique des différentes espèces et des différents sous-types (ou génotypes) est essentiel pour mieux comprendre et prévenir la cryptosporidiose. La biologie moléculaire est notamment un outil fondamental dans la compréhension de l'épidémiologie et de la diversité génomique de ce protozoaire chez les hommes comme chez les animaux (Innes et al. 2020).

i. Les techniques de détection

1. Détection par microscopie

La détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'environnement, l'eau, la nourriture ou les fèces se réalisaient généralement par microscopie. Depuis d'autres techniques ont été développés (dont certaines décrites dans la suite du document) de manière à faciliter la détection de *Cryptosporidium*. Néanmoins, ces méthodes restent fastidieuses et demandent une bonne compétence dans la reconnaissance morphologique des oocystes (Jex et al. 2008). Les oocystes sont ronds à ovoïdes, petits, et incolores. Il est extrêmement difficile, voire impossible, de différencier les oocystes des différentes espèces de *Cryptosporidium* car aucun des oocystes ne présente de trait distinctif d'une espèce à l'autre.

La taille des oocystes de *C. parvum* et *C. bovis* sont équivalentes, 5,4 x 4,9 µm et 4,9 x 4,6 µm respectivement. Ceux de *C. ryanae* sont moins grand, 3,7 x 3,2 µm et ceux de *C. andersoni* sont plus grand, 7,4 x 5,5 µm, les rendant plus facilement identifiables (Wyatt, Riggs, Fayer 2010). La sensibilité du diagnostic peut également être diminué par une faible concentration en oocystes de l'échantillon, pouvant être due à une excrétion irrégulière des oocystes dans les échantillons récoltés, ou due à des oocystes modifiés morphologiquement (mécaniquement ou par action enzymatique) (Danišová et al. 2018). Aucune de ces méthodes ne permet réellement de différencier les espèces de *Cryptosporidium* entre elles.

1.1. Les techniques de concentration

1.1.1. Techniques de sédimentation

Elle consiste à concentrer les oocystes de *Cryptosporidium* dans le culot tout en éliminant le maximum de débris. Il est possible d'augmenter la sensibilité de cette technique en rajoutant certains produits : du formol pour fixer et conserver le parasite, ou de l'éther pour éliminer les matières grasses (Rieux 2013).

1.1.2. Techniques de flottation

Elle consiste à utiliser la différence de densité entre le milieu liquide du réactif utilisé et des oocystes pour faire flotter ces derniers. Les oocystes remontent donc à la surface du liquide et sont récupérés pour être identifiés (Rieux 2013).

1.2. Les techniques de coloration

1.1.1. Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée

On utilise généralement 2 colorants pour cette coloration : la fuchsine de Ziehl et le vert de malachite. Les oocystes apparaissent alors rouges sur un fond vert (ou bleu si la contre-coloration est réalisée au bleu de méthylène). Avec cette coloration il faut faire attention à ne pas confondre les oocystes avec des levures, des spores ou des bactéries (Rieux 2013).

1.1.2. Coloration de Heine

Elle consiste à mélanger le colorant (carbolfuschine) en proportions égales avec les fèces pendant une minute. Le mélange obtenu est alors étalé en frottis et séché à l'air. Les lames doivent être observées dans les 15 minutes suivant l'étalement. Les oocystes, qui sont non colorés, apparaissent brillants sur un fond rose. Les éléments non parasitaires eux, apparaissent rouges (Rieux 2013).

2. Détection par techniques d'immunologie

Tout comme la détection par observation microscopique, ces méthodes ne permettent pas de différencier les différentes espèces de *Cryptosporidium*, et ne permettent pas d'identifier un sous-type. Cependant, les utilisateurs des kits commerciaux de ces différents tests attirent l'attention sur leur rapidité et leur sensibilité, ce qui permettrait d'avoir une image globale de

l'infection du cheptel (mais pas un diagnostic individuel) (Danišová et al. 2018). En plus de cela le prix de ces tests est plus accessible au public.

Toutefois la fiabilité de ces tests est controversée, en effet ils ne ciblent majoritairement que *C. parvum* et/ou *C. hominis*, alors que d'autres espèces peuvent être impliquées dans les cas de cryptosporidiose comme vu précédemment. Une étude réalisée par Danišová et al. en 2018 a également comparé plusieurs techniques immunologiques du diagnostic de la cryptosporidiose chez des animaux d'élevage (cochon, veau et agneau) ; les sensibilités du kit ELISA et du test par immunochromatographie (par rapport au test de référence réalisé par PCR) étaient de 40,9 % et de 22,7 % respectivement alors que leurs spécificités respectives étaient de 78,9 % et 100 % (Danišová et al. 2018).

2.1. Immunofluorescence directe

En recherche des anticorps monoclonaux (couplés à un fluorophore) dirigés contre des antigènes de surface des oocystes ont été produits. Ils permettent, après une stimulation par des UV (via le système de filtre FITC) de visualiser les oocystes. Ces derniers apparaissent alors verts pomme (Rieux 2013). La principale limite de cette technique est la variation d'interprétation dû au technicien, en effet la lecture du test repose sur l'intensité visuelle de la fluorescence et donc sur la vision de l'opérateur (Jex et al. 2008).

2.2. ELISA

Cette technique consiste à rechercher la présence d'antigènes de *Cryptosporidium*. Il existe de nombreux kits commerciaux utilisant cette technique (Rieux 2013). La spécificité de ces tests est élevée (98 à 100 %) mais la sensibilité peut être plus faible que celle de l'observation microscopique. Cependant, un de ses avantages est que ce test peut détecter l'infection sur un animal n'excrétant pas encore d'oocystes (Jex et al. 2008).

2.3. Immunochromatographie

Elle consiste à utiliser des bandelettes où des anticorps dirigés contre des antigènes de *Cryptosporidium* sont fixés. L'échantillon à tester est appliqué au niveau d'une zone dédiée à l'une des extrémités de la bandelette. Si l'échantillon contient des antigènes, une liaison antigène-anticorps va se réaliser. Le complexe ainsi formé va migrer le long de la bandelette par capillarité et sera arrêté par des anticorps de capture fixés au niveau d'une surface spécifique. La liaison antigène-corps sera ensuite révélée par l'apparition d'une bande colorée.

Une deuxième bande colorée, plus éloignée, permet de contrôler le bon fonctionnement de la réaction. Si celle-ci n'apparaît pas, le résultat n'est pas valide (Aubry, Gaüzère 2018). Cette technique est moins sensible mais permet d'être utilisée sur le terrain par le vétérinaire directement chez l'éleveur (Rieux 2013).

ii. Les techniques d'identification moléculaire

Les techniques moléculaires sont plus précises et permettent d'identifier les espèces et sous-types de *Cryptosporidium*. Elles sont donc majoritairement utilisées pour la recherche et les études épidémiologiques (Wyatt, Riggs, Fayer 2010).

1. Extraction de l'ADN

Cette étape consiste à extraire, depuis des échantillons concentrés, ou directement depuis de la matière fécale, l'ADN contenue dans ceux-ci. Cette étape est critique, car son bon déroulement conditionne la réussite de l'identification par la suite. Si l'extraction n'est pas optimisée, il est possible d'obtenir dans les étapes suivantes des faux négatifs à cause du matériel « faussement » trop pauvre en ADN (Rieux 2013). De nombreux kits commerciaux existent mais ils n'ont pas tous la même précision (Rieux 2013).

2. Réactions d'amplifications en Chaîne par Polymérase (PCR)

Une PCR est plus spécifique qu'une détection par observation microscopique et est moins dépendante du facteur humain (contrairement à l'immunofluorescence directe). Cependant, cette méthode a un coût élevé, et ne permet pas de différencier les oocystes infectants des non-infectants. Les résultats peuvent être influencés par des facteurs inhibant la réaction enzymatique de PCR. En revanche, elle permet d'identifier les différentes espèces de *Cryptosporidium* et le sous-typage de *C. parvum* et *C. hominis* (Ahmed, Karanis 2018).

Cette technique est plus sensible, pour détecter *Cryptosporidium* spp. que les précédentes techniques (grâce à l'amplification de l'ADN extrait de la matière fécale) (Leetz et al. 2007). Les PCR nichées seraient plus sensibles et spécifiques que les PCR traditionnelles mais ce sont les PCR quantitatives qui seraient les plus sensibles (Rieux 2013).

2.1. PCR 18S

Cette méthode est celle majoritairement utilisée pour l'identification des espèces de *Cryptosporidium* (Chalmers et al. 2018). C'est une PCR ciblant le gène qui code pour la SSU ARNr (le génome de *Cryptosporidium* en contenant un grand nombre de copies). Ses régions hautement polymorphiques permettent de différencier les espèces. D'autres marqueurs tels que le gène codant pour la protéine de paroi de l'oocyste de *Cryptosporidium* (cowp – *Cryptosporidium* oocyst wall protein) ont été utilisés dans différentes études mais beaucoup moins fréquemment (Xiao 2010). Les « espaceurs internes transcrits » (ou Internal transcribed spacer – ITS) de l'ADN ribosomal ont aussi été utilisés pour la spéciation de *Cryptosporidium*. Mais leurs séquences présentant une plus grande variabilité intra-espèces que la SSU ARNr, leur utilisation est plus contraignante (Jex, Gasser 2009). Un inconvénient majeur de la PCR 18S est qu'elle ne permet l'identification que de l'espèce majoritaire au sein de l'échantillon (Rieux 2013).

2.2. PCR RFLP

Cette technique permet, contrairement à la précédente, d'identifier les différentes espèces au sein d'un échantillon lors d'infections mixtes. Elle consiste à digérer les produits amplifiés par PCR 18S via des enzymes de restriction et à les faire migrer sur gel d'agarose. Les enzymes n'ont pas la même cible sur l'ADN selon les différentes espèces. L'identification d'une espèce dépend de son amplification lors de la PCR 18S. Ainsi, une espèce minoritaire dans l'échantillon peut ne pas apparaître sur le gel d'agarose (Rieux 2013). Il existe aussi d'autres loci qui peuvent être utilisés comme marqueur, comme les gènes codant pour la cowp, la protéine de choc thermique 70kDa (hsp70), la protéine adhésive « thrombospondin-related » (trap) ou la gp60 (Jex et al. 2008).

2.3. PCR quantitative

Il n'existe pas de protocole défini et standardisé pour la détection ou la quantification de *Cryptosporidium*. Cependant différents protocoles ont été réalisés à partir de deux techniques. La première technique utilise des substances s'intercalant dans le double brin d'ADN et qui sont ensuite révélées pour quantifier. Seulement, il est nécessaire d'utiliser des amorces très spécifiques du gène cible. La seconde technique utilise des sondes ciblant l'ADN. Le gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal 18S est le plus utilisé dû à son grand nombre de copies (Rieux 2013). Il a été démontré que cette technique pouvait détecter

l'ADN de *Cryptosporidium* dans un échantillon dès la présence de dix oocystes (Ahmed, Karanis 2018).

3. Sous-typage de *C. parvum*

3.1. PCR gp60

Le séquençage de la glycoprotéine 60kDa est régulièrement utilisé pour sous-typer *Cryptosporidium* du fait de l'hétérogénéité de ses séquences et de son utilité dans la biologie du parasite (rôle supposé dans la virulence du parasite) (Innes et al. 2020). En effet, elle est située à la surface apicale des formes invasives du parasite et est une cible pour les anticorps chez les humains (Xiao 2010).

Elle est définie par la répétition d'un motif codant pour une sérine en position 5' (TCA, TCG, TCT). On observe une variation du nombre de répétition, et des différences au niveau de zones non répétées de ce gène permettant de catégoriser *C. parvum* en famille (IIa, IIc, IId etc.). Au sein de chaque famille, les différents sous-types sont distingués par le nombre de répétition des trinuécléotides (Rieux 2013).

3.2. Genotypage multilocus

On peut utiliser d'autres marqueurs, pour identifier les sous-types de *C. parvum*, comme des micro et des minisatellites. Le Multilocus Typing (MLT) ou Multilocus sequence typing (MLST) sont des techniques récentes permettant cette caractérisation. Le MLT consiste à analyser la taille des fragments des produits amplifiés par électrophorèse capillaire ou par gel de polyacrylamide haute résolution. Le MLST est basé sur les hétérogénéités de séquence des différents loci (Rieux 2013).

Selon les besoins, les utilisateurs choisiront une méthode de diagnostic plutôt qu'une autre en fonction des avantages et inconvénients de chaque test (Checkley et al. 2015). Si le diagnostic doit être effectué rapidement on choisira majoritairement un kit pouvant être utilisé directement sur le terrain. Tandis que lors de recherches épidémiologiques, on se tournera plutôt vers une méthode plus longue et coûteuse mais plus sensible, comme la PCR.

d. Facteurs de risques de la cryptosporidiose bovine

Actuellement les facteurs de risque de la cryptosporidiose bovine ne sont que peu voire pas connus. En effet même si l'on pense que les facteurs de risque des DN s'y appliquent de manière générale, ce n'est pas forcément le cas pour ce parasite. Il n'existe que peu d'études sur ce sujet, et elles sont majoritairement réalisées en élevage laitier, délaissant ainsi les élevages allaitants. De plus les études se concentrent majoritairement sur *C. parvum* et non sur les *cryptosporidium* de manière générale, réduisant encore le nombre de données disponibles.

C'est le constat notamment réalisé par Brainard et al. dans leur revue systématique des études d'identification des facteurs de risque ou de protection qui pourraient prévenir l'infection par *C. parvum* chez les veaux. Ils n'ont identifié que 14 publications répondant à leurs critères dont seulement trois de qualité jugée supérieure. Les veaux faisaient très majoritairement partie de la production laitière (11 études portaient uniquement sur la production laitière, trois étaient mixtes, laitière et bovine). Les études ont été réalisées en Europe (6 études), en Amérique du Nord (6 études), en Nouvelle-Zélande et en Égypte (une étude chacun). La prévalence de *C. parvum* était de 6 à 78 % chez les veaux dans les études, et elles ont évalué entre 1 et 119 troupeaux et entre 63 et 2249 animaux individuellement (Brainard et al. 2020).

Les trois études jugées les plus solides d'un point de vue méthodologique par Brainard et al. sont celles de : Trotz-Williams et al. (2008), qui ont mené une étude dans 119 troupeaux canadiens, échantillonnant 1089 veaux âgés de 7 à 28 jours ; Urie et al. (2018) qui ont mené une étude dans 104 troupeaux américains, échantillonnant 2249 veaux âgés de 3 à 66 jours ; et Silverlas et ses collègues (2009) qui ont mené une étude dans 50 troupeaux suédois comprenant 500 veaux âgés de 2 mois maximum (Trotz-Williams et al. 2008; Urie et al. 2018; Silverlås et al. 2009; Brainard et al. 2020).

L'étude de Silverlås et al. (2009) a révélé qu'un temps plus long passé dans les parcs de vêlages avait un effet protecteur contre l'infection. De plus l'odd-ratio pour les veaux développant *C. parvum* est descendu à seulement 0,12 lorsque les mères étaient parquées dans les box de vêlages plus de 3 semaines avant la naissance, par rapport à une situation où elles étaient placées dans les box seulement 2 jours ou moins avant la naissance. Cette étude suggère ainsi qu'une séparation plus précoce des mères avant la naissance avec le reste du troupeau serait protectrice (Brainard et al. 2020).

Par ailleurs, lorsqu'un veau naissait dans un enclos contenant plusieurs mères (plutôt qu'une seule), cela augmentait le risque de maladie dans l'étude de Matoock et al. (2005), mais

pas dans celle de Trotz-Williams et al. (2007) ou de Weber et al. (2016). Aucune autre étude n'a évalué correctement ce risque. Les preuves restent donc limitées et mitigées quant à l'importance du partage des cases de mise bas par les mères (Brainard et al. 2020; Weber et al. 2016; Matoock, El-Bably, El-Bahy 2005; Trotz-Williams et al. 2007).

Il semble probable que le fait de garder les veaux avec les mères longtemps après la naissance ait rarement été évalué car, dans l'industrie laitière, la séparation des veaux des mères très peu de temps après la naissance est une pratique standard. Seules deux études (Trotz-Williams et al. 2008; Silverlås et al. 2009) ont considéré cette pratique comme un facteur de risque associé à la gestion du troupeau. La séparation à la naissance n'a eu aucun impact dans l'étude de Trotz-Williams et al. (2008), mais des séjours plus longs avec la mère (jusqu'à 4 jours) ont eu un effet protecteur croissant dans l'étude de Silverlås et al. (2009). L'importance de la durée du temps que le veau passe avec sa mère après la naissance n'est donc pas clairement définie (Brainard et al. 2020).

Six études ont examiné si certaines races étaient plus sensibles à l'infection. Une étude (Imre et al. 2015) a constaté que les animaux de " race pure " (race pure versus croisée non définie) étaient plus à risque que les races croisées. Trois études (Szonyi et al. 2012; Maddox-Hyttel et al. 2006; Urie et al. 2018) ont évalué les veaux Holstein par rapport aux veaux Jersey et n'ont pas trouvé de risques liés à la race dans les analyses multivariées. Deux autres études (Brook et al. 2008; Al Mawly et al. 2015) ont recherché d'autres différences entre races (d'autres races ont été comparées, et pas seulement Holstein vs Jersey) et n'ont trouvé aucune différence. Urie et al. (2018) est la seule étude qui a définitivement considéré la race et qui a conclu que ce n'était pas un facteur de risque (Holstein vs Jerseys). Brainard et al. (2020) ont ainsi considéré qu'il n'y avait pas d'argument clair en faveur de différences significatives de sensibilité à *C. parvum* entre les principales races de bovins laitiers.

Une difficulté importante pour évaluer si la consommation du colostrum a un impact sur la cryptosporidiose est que la plupart des études ne mentionnent pas si les veaux ont reçu du colostrum ou quel traitement a subi le colostrum ou comment il a été donné (Brainard et al. 2020). Une étude a été menée par Asenopoulos et al. pour évaluer l'effet de la qualité et de la quantité de colostrum sur la diarrhée du veau provoquée par *Cryptosporidium* spp. dans une ferme laitière intensive en Grèce. Au total, 71 % des veaux sélectionnés (100 veaux sélectionnés au hasard) étaient positifs pour les oocystes de *Cryptosporidium* spp. Les analyses ont révélé que l'augmentation de la quantité de colostrum reçu le premier jour de vie permettait de

diminuer l'excrétion fécale d'oocystes (Arsenopoulos, Theodoridis, Papadopoulos 2017). Ces résultats ont également été influencés par la qualité du colostrum et la saison de naissance du veau. Il existe de faibles preuves que l'administration de colostrum pourrait être protecteur contre l'infection par *C. parvum*, mais la consommation de colostrum en tant que facteur de risque ou de protection n'a pas été testée correctement.

Delafosse et al. ont remarqué dans leur étude que les facteurs de risque significativement associés à l'excrétion de *C. parvum* étaient la distribution du colostrum à l'aide d'un seau et l'alimentation du veau avec du lait fermenté (Delafosse et al. 2015). Il n'y a pas de preuves cohérentes qu'un système d'alimentation spécifique pour le colostrum (ou le lait) soit plus risqué ou protecteur que les autres (Brainard et al. 2020). Deux études ont révélé que l'utilisation de lactoreplaceurs (plutôt que du vrai lait) entraînait un risque plus élevé d'excrétion d'oocystes. Díaz et al. (2018) ont signalé une probabilité plus élevée d'infection pour les veaux nourris avec des lactoreplaceurs, tandis que Trotz-Williams et al. (2008) ont constaté que l'utilisation de lactoreplaceurs avant l'âge de 7 jours était associée à une probabilité plus élevée d'infection (Díaz et al. 2018; Trotz-Williams et al. 2008). Trois autres études (Trotz-Williams et al. 2008; Urie et al. 2018; Imre et al. 2015) ont montré que l'utilisation de lactoreplaceurs ne faisait que peu ou pas de différence dans le risque de cryptosporidiose. Les deux études de meilleure qualité ont conclu que l'utilisation d'un aliment d'allaitement n'avait aucune incidence (Urie et al. 2018) ou augmentait le risque (Trotz-Williams et al. 2008). Les preuves que l'utilisation d'aliment d'allaitement augmente le risque de cryptosporidiose sont mitigées et non concluantes ; cependant, ce facteur de risque est très variable et nécessiterait une investigation plus importante (Brainard et al. 2020).

Huit études ont pris en compte la taille du troupeau dans leurs modèles d'analyse. Cinq n'ont pas trouvé que la taille du troupeau avait une importance. Trois études (Szonyi et al. 2012; Silverlås et al. 2009; Urie et al. 2018) ont constaté un risque plus élevé d'excrétion de *C. parvum* par les veaux lorsque la taille du troupeau est importante. Les odds-ratios pour les troupeaux de plus grande taille dans leurs modèles allaient de 1,55 à 292 (effets potentiellement très forts). Les trois études retenues comme de haute qualité ont considéré la taille du troupeau comme un facteur de risque. Trotz-Williams et al. (2008) n'ont trouvé aucun effet, tandis que les deux autres études (Urie et al. 2018; Silverlås et al. 2009) ont observé un risque accru pour les grands troupeaux. Il existe des preuves cohérentes que les grands troupeaux peuvent être associés à des niveaux élevés d'infection par *C. parvum* (Brainard et al. 2020).

L'apparition antérieure de diarrhées parasitaires (*C. parvum* ou Giardia) dans les exploitations a été considérée par trois études comme un facteur de risque d'infection récente par *C. parvum*. Deux études n'ont trouvé aucune preuve d'une augmentation du risque, tandis que Starkey et al. (2005) ont constaté qu'une occurrence antérieure augmentait les chances que les veaux excrètent *C. parvum* pendant la période d'observation (Starkey et al. 2005). Silverlås et al. (2009) est une des seules études qui a pris en compte le fait que le troupeau ait des antécédents de maladies diarrhéiques relativement plus importants et a constaté que les infections antérieures n'influençaient pas la probabilité de nouvelles infections. Ces données sont relativement cohérentes, ce qui suggère que les infections futures ne sont pas inévitables après une première épidémie (Brainard et al. 2020).

Deux études ont considéré la production laitière en système biologique (bio) comme un facteur de risque possible (par rapport à la production laitière conventionnelle) ; les deux études ont constaté que le risque était plus élevé dans les systèmes bio : Maddox-Hyttel et al. (2006) et Silverlås et al. (2009b). Aucune autre étude n'a évalué l'agriculture biologique comme facteur de risque. Il existe donc des preuves limitées mais cohérentes que les troupeaux en bio ont plus de risques d'infections à *C. parvum* (Brainard et al. 2020).

Matoock et al. (2005) et Silverlås et al. (2009) ont tous deux évalué certains aspects de la quarantaine : Matoock et al. ont examiné si le fait d'avoir des soigneurs dédiés réduisait le risque de transmission dans un troupeau, tandis que Silverlås et al. (2009) (une étude de haute qualité) ont examiné la politique d'isolement des veaux malades des animaux sains. Aucune des deux études n'a trouvé d'association entre l'isolement et le risque d'infection par *C. parvum* (Brainard et al. 2020).

La densité de peuplement a été évaluée par Brook et al. (2008) et par Silverlås et al. (2009). Les preuves sont limitées, mais aucune relation entre la densité de peuplement et le risque d'infection n'a été trouvée (Brainard et al. 2020).

La rotation des animaux n'a été évaluée que par une seule étude : Silverlås et al. (2009). Silverlås et al. ont constaté que les exploitations qui appliquaient une politique impliquant le déplacement du bétail dans des zones à des moments variables (pas toutes les entrées et sorties en même temps) augmentaient considérablement le risque d'infection. Les preuves sont très limitées mais solides ; il s'agit potentiellement d'un facteur de risque facilement modifiable qui mériterait une étude plus approfondie (Brainard et al. 2020).

Il existe des preuves cohérentes (Trotz-Williams et al. 2008) que les sols en béton sont plus sûrs que les sols souples, mais ce résultat peut être lié à d'autres pratiques d'hygiène plutôt qu'à quelque chose d'intrinsèque au béton en tant que type de sol (Brainard et al. 2020). Aucune étude retenue comme de qualité supérieure par la méta-analyse n'a évalué les risques ou la protection liés aux sols en caillebotis. Il existe des preuves limitées que les caillebotis peuvent réduire le risque de cryptosporidiose (Brainard et al. 2020) et que la litière de paille peut conférer un risque plus élevé. Aucune preuve significative n'existe concernant les autres types de litière (Brainard et al. 2020). Les preuves concernant la profondeur optimale de la litière sont limitées et non conclusives (Brainard et al. 2020).

Díaz et al. (2018) ont constaté que l'utilisation de désinfectants augmentait fortement le risque de maladie, mais n'ont pas décrit exactement comment les désinfectants étaient utilisés. L'étude de Trotz-Williams et al. (2008), a indiqué que le lavage des ustensiles d'alimentation avec un désinfectant (par rapport à l'eau et au savon ou à l'absence de lavage) n'avait aucun impact sur le risque de maladie. En revanche, le lavage à l'eau et au savon (par rapport à l'absence de nettoyage/désinfection) réduisait le risque d'infection. Les preuves sont limitées et non concluantes quant à la meilleure façon de nettoyer les ustensiles d'alimentation (Brainard et al. 2020). Il est très peu probable qu'une routine de nettoyage spécifique affecte de manière cohérente le risque de maladie (Brainard et al. 2020).

Deux études ont examiné si les co-infections avec d'autres agents pathogènes (connus comme agents de DN) pouvait être liée à l'excrétion d'oocystes de *C. parvum*. Al Mawly et al. (2015) ont conclu que la présence et la gravité de la cryptosporidiose étaient significativement plus importantes en cas de co-infection avec d'autres agents pathogènes, mais n'ont pas donné plus de détails sur cette analyse. Trotz-Williams et al. (2007) est la seule étude à avoir rapporté de manière complète que l'infection à *C. parvum* était plus probable en présence d'une co-infection avec un autre pathogène connu comme responsable de DN. Ils ont notamment évalué la positivité à *C. parvum* par rapport aux infections aux rotavirus bovins et aux coronavirus bovins. Les preuves sont cohérentes mais limitées, la co-infection avec d'autres agents pathogènes responsables de DN rendent l'infection par *C. parvum* plus probable (Brainard et al. 2020).

Ainsi plusieurs facteurs de risques ont été testés et analysés mais peu de consensus ont pu être réalisés pour la cryptosporidiose. Beaucoup de ces facteurs nécessitent probablement plus d'études et d'analyses, afin de déterminer leurs enjeux.

e. Contrôle et prévention

Il existe actuellement peu d'options pour aider à prévenir et à traiter la cryptosporidiose chez l'homme. Aucun vaccin n'est disponible et un principe actif est approuvé par la FDA : le nitazoxanide. Celui-ci est efficace chez les personnes immunocompétentes mais ne l'est pas chez les personnes gravement immunodéprimées. L'éducation sur les voies de transmission et le lavage des mains sont des mesures pratiques de santé publique environnementales préventives pour aider à réduire l'incidence de la maladie (Innes et al. 2020).

En raison de l'absence de vaccin contre la cryptosporidiose chez le bétail, la prévention et le contrôle de la maladie passent actuellement par le soutien de la résistance des veaux au cours des premières semaines de leur vie, ainsi que par la diminution du risque d'exposition au parasite (Innes et al. 2020).

i. La résistance de *Cryptosporidium*

Les oocystes de *Cryptosporidium* sont très résistants, que ce soit aux variations naturelles de l'environnement (température, humidité) ou à de nombreux produits désinfectants (Rieux 2013). En effet ils montrent une grande résistance à la plupart des désinfectants commercialisés, ou alors ils n'y sont sensibles qu'à une dose seulement atteignable en laboratoire. De tous les désinfectants, les plus efficaces sont ceux contenant du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de chlore ou de l'ammoniac (Fayer, Xiao 2008). À la suite d'études sur cette résistance, il a été observé que les oocystes peuvent survivre jusqu'à 18 mois dans de l'eau froide à 4°C, et jusqu'à 7 mois dans de l'eau tiède à 15°C (Santé Canada 2019). Ils ne sont inactivés qu'à des températures supérieures à 60°C ou inférieures à -22°C (Innes et al. 2020). Sur ce point, les chercheurs ont trouvé une corrélation entre le temps de survie des oocystes et la température de l'eau. En augmentant cette dernière, le temps de survie diminue (King, Monis 2007). Il a également été observé que la terre a un effet protecteur sur les oocystes, elle augmente leur temps de survie. Elle permet de diminuer le stress physico-chimique avec l'enfouissement des oocystes. La concentration en ammoniacque n'étant pas suffisante pour détériorer l'oocyste, et le milieu les protège de la dessiccation (King, Monis 2007). De même,

les fèces des animaux leur confèrent un environnement favorable à leur survie et constituent ainsi un réservoir pour les oocystes infectieux (Rieux 2013). Cela explique partiellement la difficulté des éleveurs à éliminer la cryptosporidiose une fois qu'elle est présente dans leurs élevages, dûe à une contamination des pâtures et des bâtiments d'élevages prolongée et difficile à maîtriser. Son épidémiologie et sa forte résistance en font un parasite extrêmement difficile à gérer.

ii. Traitement

Comme dit précédemment, peu de traitements sont disponibles, ils seront donc majoritairement symptomatiques. Les veaux atteints de cryptosporidiose doivent être logés séparément jusqu'à au moins une semaine après l'arrêt de la diarrhée, car l'animal peut encore excréter des oocystes. On réalise donc une thérapie de soutien aux veaux associant de la réhydratation avec le fait de les garder au chaud, propres et secs. Il existe actuellement deux produits de traitement autorisés pour les veaux : le lactate d'halofuginone et la paromomycine (non autorisée en France pour cette indication à l'heure actuelle) (Innes et al. 2020).

1. Le lactate d'halofuginone

Le lactate d'halofuginone, connu sous le nom commercial de Halocur®, est donné en prophylaxie dans les 48h suivant la naissance, et en curatif dans les 24h suivant le début des signes cliniques. Il doit être administré par voie orale une fois par jour, pendant 7 jours consécutifs à la posologie de 100µg d'halofuginone pour 10kg de poids vif, correspondant à 2ml d'Halocur® pour 10kg de poids vif. Il ne doit pas être donné lorsque l'estomac est vide. L'administration peut donc être plus ou moins difficile, notamment selon le mode d'élevage (Thomson et al. 2017). En effet, les élevages laitiers séparent le couple veau/mère dès la naissance et les veaux sont généralement élevés dans des logements individuels durant leurs premières semaines de vie, contrairement aux élevages allaitants, où les veaux restent auprès de leur mère.

Le mécanisme d'action du lactate d'halofuginone n'est pas clairement identifié, mais il agirait certainement sur les stades mérozoïte et sporozoïte du parasite. Le médicament agit pour réduire l'excrétion du parasite et pour réduire la gravité et la durée de la diarrhée, mais il peut être toxique chez les animaux déshydratés et doit donc être utilisé de manière appropriée (Innes et al. 2020). En effet dès l'administration d'une double dose, des symptômes de toxicité peuvent apparaître : diarrhée, hématochézie, déshydratation, prostration.

Une étude réalisée par Trotz-Williams et al. (2011) a testé l'efficacité de ce produit contre la cryptosporidiose chez des veaux Prim'Holstein. Ils ont suivi l'évolution de 259 veaux traités durant les sept premiers jours de leur vie par de l'Halocur® à la dose recommandée et de 254 veaux traités avec un placebo pendant la même durée. Ils ont observé une baisse significative de l'excrétion d'oocystes dans les trois premières semaines de vie à la suite du traitement prophylactique. En revanche, ils n'ont pas observé de relation entre le traitement et l'apparition de diarrhée (Trotz-Williams et al. 2011).

Lors d'autres études sur l'efficacité du traitement, le suivi de l'excrétion des oocystes a été réalisé. Après l'arrêt du traitement, les veaux ne sécrétaient plus d'oocystes pendant plusieurs jours mais au 7ème jour, des veaux recommençaient à excréter, suggérant une réinfection (Shahiduzzaman, Dauschies 2012). Une autre étude a été réalisée sur les effets de l'Halocur® sur l'excrétion d'oocystes et la croissance des veaux. Les chercheurs ont suivi 31 veaux mâles Prim'Holstein qui ont été divisés en deux groupes, les veaux traités versus les veaux sous placebo. La probabilité pour un veau traité d'excréter *C. parvum* était 70 % plus faible que pour un veau traité avec un placebo. De plus, les veaux du groupe ayant reçu l'Halocur® n'ont pas excrété d'oocystes avant 2 semaines de vie, alors que certains veaux du groupe placebo ont commencé à excréter des oocystes dès leur première semaine de vie. Les chercheurs ont également observé que l'apparition de diarrhée DN était globalement retardée d'environ 3 jours chez les veaux traités par rapport aux veaux sous placebo (Jarvie et al. 2005).

L'étude réalisée par Niine et al. soutient partiellement les résultats des études précédentes. En effet l'équipe a suivi l'évolution clinique de 144 veaux répartis en 3 groupes : non traités, prophylaxie incorrecte (non suivi des recommandations) et prophylaxie correcte. L'utilisation recommandée d'Halocur® a permis de retarder l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* et d'induire une plus faible mortalité chez le jeune veau. Et une utilisation incorrecte ne produisait qu'un très faible impact sur la mortalité et la production d'oocystes. Cependant, le taux de croissance des veaux a été impacté négativement par l'utilisation adéquate de l'halofuginone (Niine et al. 2018).

On peut donc conclure que même si le lactate d'halofuginone est le seul médicament autorisé pour traiter la cryptosporidiose chez le veau en France son efficacité est mitigée. Il permet certes de diminuer l'excrétion d'oocystes, mais n'impacte que peu la diarrhée et impacte probablement négativement la croissance des veaux, en plus d'avoir des effets secondaires important en cas de mauvaise utilisation.

2. La paromomycine

La paromomycine est aussi connue sous les noms commerciaux de Parofor® (poudre ou solution buvable) et Gabbrovet® (solution buvable). La paromomycine a originellement une AMM pour traiter les infections digestives à *E. coli* chez le veau. Mais elle est utilisée depuis longtemps par les vétérinaires hors AMM pour lutter contre la cryptosporidiose. Elle est depuis peu autorisée en Angleterre et en Espagne dans ce but, mais l'agence Française du médicament vétérinaire est à ce jour toujours opposée à l'utilisation de la paromomycine contre la cryptosporidiose (pour des raisons d'antibiorésistances) (Vandaële 2019).

Selon l'AMM britannique la paromomycine devrait être administrée dans le cas d'une cryptosporidiose diagnostiquée selon la posologie suivante : 50 mg/kg/j par voie orale pendant 7 jours avec un temps d'attente viande de 62 jours (Vandaële 2019).

L'antibiotique aminoside paromomycine serait également (comme le lactate d'halofuginone) efficace contre l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium*. Mais il aurait également un impact sur les signes cliniques et la mortalité chez les veaux (Thomson et al. 2017). Il agirait en se liant au ribosome du pathogène et perturberait la synthèse des protéines de celui-ci.

Une étude a mis en évidence des lésions digestives lors d'utilisation de Parofor® à fortes doses et après un usage prolongé. C'est pour cela que le résumé officiel des caractéristiques du produit (RCP) recommande de ne pas dépasser 7 jours de traitement.

D'autres études comparatives entre paromomycine et placebo ont été réalisées à l'aveugle. Durant les sept jours de traitement, entre 23 et 32 % des veaux traités ont présenté des diarrhées, contre 53 à 73 % chez les veaux non traités (Vandaële 2019).

En France son utilisation pour lutter contre la cryptosporidiose est donc possible mais sous la responsabilité du vétérinaire via la cascade.

3. Des molécules alternatives en recherche

La découverte de médicaments contre le *Cryptosporidium* a fait l'objet d'investissements considérables ces dernières années et il existe aujourd'hui plusieurs classes de composés testées. Il s'agit notamment d'inhibiteurs qui ciblent la protéine kinase 1 dépendante du calcium (CDPK1) de *Cryptosporidium* et qui sont efficaces dans plusieurs modèles *in vivo* de cryptosporidiose. Notamment dans les modèles de porcelets et de veaux gnotobiotiques, il a été montré une réduction de l'excrétion des oocystes et des signes cliniques. Les composés qui ciblent les ARNt synthétases, enzymes qui chargent les ARNt de leur acide aminé

correspondant pour qu'ils soient utilisés dans la synthèse des protéines, se sont également avérés être efficaces contre *Cryptosporidium*. Plusieurs groupes de recherches ont aussi effectué des tests de dépistage de composés ayant une activité sur des parasites apparentés et ont ainsi identifié de nouveaux composés potentiellement actifs contre *cryptosporidium*. Ces composés sont passés des tests *in vitro* aux modèles de petits animaux, puis aux études sur les veaux nouveaux-nés. Comme *C. parvum* infecte à la fois l'homme et le bétail, les nouveaux médicaments destinés à traiter les patients humains pourraient également être efficaces pour lutter contre la cryptosporidiose du bétail (Innes et al. 2020).

Une question majeure dans la découverte de médicaments est la nécessité d'une exposition gastro-intestinale par rapport à une exposition systémique. Les *Cryptosporidium* étant généralement localisés dans l'épithélium en brosse du tractus gastro-intestinal, une exposition systémique peut ne pas être nécessaire pour guérir l'infection. Les efforts actuels en matière de médicaments visent à mieux comprendre la distribution PK/PD nécessaire pour guérir la cryptosporidiose. La modélisation de cette distribution pour les humains et les bovins sera importante pour le développement de traitements efficaces (Innes et al. 2020).

4. L'ajout de levures à l'alimentation

Cryptosporidium étant résistant à de nombreux médicaments, il est normal de rechercher des méthodes de traitement alternatives. En effet en France, le seul médicament autorisé est le lactate d'halofuginone (Halocur®) mais son efficacité prophylactique est plus ou moins importante et ses effets thérapeutiques sont souvent faibles. Une étude réalisée par Vélez et al. en 2019 s'est intéressée à l'utilisation de levure. Ils comparent ainsi l'halofuginone et les produits de fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* (PFSC) chez les veaux nouveau-nés infectés par *Cryptosporidium*. Une précédente étude avait montré que lors de l'ajout de PFSC à la nourriture de jeunes veaux pendant 4 semaines on observait une diminution de l'atteinte de la villosité de l'intestin grêle. Les chercheurs ont observé une diminution de l'intensité de l'infection chez les veaux traités (Halocur® et PFSC) par rapport aux veaux non traités, sans différences entre les deux types de traitements. Cela suggère que cliniquement, les PFSC peuvent être une méthode alternative dans la gestion de la cryptosporidiose. Mais le traitement à base de PFSC n'a pas influencé la production d'oocystes chez les veaux infectés, contrairement aux veaux traités avec le lactate d'halofuginone (Vélez et al. 2019).

iii. Prévention

La prévention repose sur une bonne connaissance et gestion des facteurs de risques, comme dit précédemment pour les DN. Elle consiste donc principalement à s'assurer que les veaux reçoivent des quantités suffisantes de colostrum de bonne qualité au cours des premières heures de leur vie et les loger dans des enclos propres, secs et chauds avec des mangeoires et des abreuvoirs surélevés afin de minimiser l'exposition aux parasites *Cryptosporidium* présents dans l'environnement (Innes et al. 2020).

1. Prophylaxie hygiénique

La prévention au sein de l'élevage, peut être réalisée par l'éleveur en essayant d'agir sur la transmission du parasite (en la limitant). Cette transmission est réalisée par la dissémination des oocystes excrétés par les animaux contaminés. Les oocystes sont excrétés massivement par les hôtes sensibles tels que les veaux non-sevrés. Du fait de l'industrialisation, les oocystes ont tendance à être concentrés autour d'une population fixe (animal ou humaine). Cette population est donc plus à risque. Pour éviter ce phénomène, il serait envisageable de délocaliser régulièrement cette population vers des zones saines. Mais en pratique c'est difficilement réalisable pour une majorité des cheptels (Fayer, Xiao 2008).

Les actions contre la cryptosporidiose en élevage doivent ainsi commencer par une prophylaxie hygiénique. La désinfection et de bonnes pratiques d'hygiène sont les outils principaux de la lutte contre *Cryptosporidium* (Fayer, Xiao 2008). Cela permet de diminuer la pression d'infection au sein du cheptel. Pour cela, il faut réaliser un nettoyage des locaux efficace incluant la maternité, les logements individuels des veaux pour les élevages laitiers et, si possible, d'y associer un vide sanitaire régulier. La désinfection doit être réalisée à l'aide de désinfectants actifs contre *Cryptosporidium* : l'ammoniac entre 5 et 10 % (Rieux 2013). A cela se rajoute la nécessité d'isoler les jeunes veaux atteints cliniquement de DN (principale source de contamination de l'environnement). Et pour les veaux de manière générale il est nécessaire de leur donner un colostrum de qualité et en quantité suffisante à la naissance, de changer fréquemment la litière, de leur apporter une alimentation appropriée, de réaliser un lavage systématique des mains entre chaque manipulation, ou encore de désinfecter le matériel régulièrement avec des désinfectants adaptés et en respectant les temps de contact préconisés (Alzieu et al. 2012).

Pour réduire la charge parasitaire dans les élevages la chaleur est un avantage. En effet bien que les oocystes soient résistants jusqu'à -20°C, ils sont sensibles aux températures

élevées. Il a été montré que les oocystes deviennent non-infectieux après 5 minutes à 64,2°C ou après 1 minute à 72,4°C, et que dans le lait, ils le sont après 5 secondes à 71,7°C (Fayer, Xiao 2008). Il serait donc intéressant de nettoyer les locaux avec de l'eau très chaude (à plus de 70°C) puis d'effectuer un séchage (Thomson et al. 2017).

2. Vaccination des mères

En l'absence de médicaments efficaces, le vaccin joue un rôle important dans la prévention de la cryptosporidiose. Or il n'existe actuellement aucun vaccin pour prévenir la cryptosporidiose chez les animaux d'élevage et, comme la maladie se manifeste principalement chez les très jeunes veaux, il pourrait être difficile de générer, suffisamment rapidement, une immunité protectrice contre le parasite par une vaccination active. Une stratégie alternative, telle que celle utilisée actuellement pour vacciner les mères contre d'autres agents pathogènes provoquant des maladies diarrhéiques (par exemple, les rotavirus, les coronavirus et *E. coli*), pourrait également fonctionner pour *Cryptosporidium* en générant une immunité spécifique chez la mère, qui est transmise au veau par le colostrum, aidant ainsi le veau à résister à la maladie pendant ces premières semaines cruciales de la vie. Des résultats prometteurs, travaillant sur l'immunité passive, ont été obtenus par l'immunisation de mères avec des protéines recombinantes P23 et CP15 pour générer un colostrum hyperimmun contenant des anticorps spécifiques et d'autres facteurs immunitaires qui peuvent aider à protéger les jeunes veaux contre la Cryptosporidiose (Innes et al. 2020).

Une étude a été menée par Burton et al. en 2018 sur la réponse humorale de 20 vaches gravides après administration d'un vaccin réalisé à partir d'une protéine recombinante rCP15/60 de *C. parvum* (comparé à 20 vaches témoins). L'équipe de recherche a également étudié la réponse en anticorps de 19 veaux nourris avec le colostrum immunisé contre le rCP15/60 de ces vaches vaccinées par rapport à 20 veaux témoins. Les vaches vaccinées avec le vaccin rCP15/60 ont produit une réponse en anticorps significativement plus importante par rapport aux témoins et cette réponse était fortement associée au niveau ultérieur d'anticorps colostraux. Les veaux nourris au colostrum immunisé par rCP15/60 ont montré une absorption dose-dépendante des anticorps, également associée aux niveaux d'anticorps colostraux. Cette étude a montré que le transfert passif des anticorps est donc réalisable, mais les chercheurs n'ont pas étudié l'effet de ce transfert sur l'immunité du veau, ou sur la cryptosporidiose en elle-même (Burton et al. 2011). De même, les antigènes GP60, CpH1 et CpSUB2 ont été définis comme potentiels candidats à la création d'un vaccin contre *C. parvum* (Tomazic et al. 2018).

Une étude réalisée sur la protéine recombinante P23 chez le veau a eu des résultats encourageants bien que les conditions expérimentales soient strictes et non répétables chez les éleveurs. Ils ont mis au point un vaccin utilisant la protéine recombinante P23 et ont immunisé les vaches gravides quatre fois, à partir de 70 jours avant parturition, toutes les deux semaines. Après la parturition, chaque veau a reçu le colostrum de sa mère et a été confronté à une charge infectante de 1×10^7 oocystes de *C. parvum* après 12h de vie. Les résultats ont montré que, contrairement au groupe témoin, le titre d'anticorps dans les sérums et le colostrum de première traite des vaches immunisées a augmenté de manière significative et que les veaux nourris au colostrum hyperimmun n'ont pas présenté de signes de cryptosporidiose (diarrhée, déshydratation, dysorexie ou apathie). De plus, le colostrum enrichi a non seulement réduit de manière significative la quantité d'excrétion d'oocystes (de 90% par rapport au groupe témoins) mais a également retardé son apparition. Leur étude montre donc que la protéine recombinante P23 pourrait être utilisée pour l'immunisation passive des veaux nouveaux-nés contre *C. parvum* car elle stimule le système immunitaire des vaches et engendre la production d'un colostrum hyperimmunisé contre *C. parvum*. Les veaux recevant ce colostrum sont également plus compétents pour se défendre contre la cryptosporidiose (Askari et al. 2016).

3. Vaccination des veaux

Les mécanismes immunitaires de protection des veaux contre les parasites *Cryptosporidium* ne sont pas bien compris et font probablement intervenir des réponses immunitaires à la fois humorales et à médiation cellulaire. Les réponses d'anticorps contre plusieurs antigènes dominants de *Cryptosporidium*, tels que gp15, cp15 et cp23, qui jouent probablement un rôle dans l'attachement du parasite et l'invasion des cellules hôtes, pourraient être des candidats importants pour un vaccin (Innes et al. 2020).

Il n'existe donc pas à ce jour de vaccin contre la cryptosporidiose. Les chercheurs se sont tout de même intéressés à la réponse vaccinale des veaux. Des études ont donné des résultats intéressants dans des conditions expérimentales, les veaux immunisés avec des oocystes inactivés ont montré une réduction de la diarrhée et de l'excrétion des oocystes. Néanmoins, le vaccin n'était pas efficace sur le terrain (Thomson et al. 2017).

Un vaccin efficace qui minimiserait la maladie chez le bétail et réduirait l'excrétion d'oocystes dans les fèces aurait un impact significatif sur la santé et le bien-être du bétail et

réduirait également la contamination de l'environnement des élevages et des zones de captage plus larges par des oocystes infectieux (Innes et al. 2020).

Partie III : Etude expérimentale sur les facteurs de risque de la cryptosporidiose du jeune veau en Bretagne

A. Introduction

En Bretagne la mortalité des jeunes veaux est un enjeu majeur, en effet plus de 13% d'entre eux meurent entre 0 et 75j de vie (correspondant à plus d'un veau sur 10). De plus environ 15% des veaux bretons seront malades entre 0 et 15j de vie, la diarrhée étant la 2^{ème} cause de mortalité des veaux après la mortalité au vêlage (Comités de développement du Finistère 2014; Jegou et al. 2006).

Ces diarrhées entraînent des pertes économiques pour l'éleveur (dépense en soins vétérinaires et traitements, pertes dues au retard de croissance...), mais également des pertes de temps (augmentation du temps de soin des animaux ...). Ces problèmes impactent ainsi physiquement et mentalement les éleveurs (journées plus longues, inquiétude sanitaire et financière ...).

C'est dans ce contexte que le projet HealthyCalf a vu le jour. Ce projet réunissant 8 partenaires propose une approche innovante pour améliorer la santé des veaux en utilisant la partie génétique de l'immunité innée du veau. L'objectif final du projet étant de proposer une méthode simple de phénotypage de la compétence immunitaire innée des veaux. Cette approche permettrait d'identifier les animaux les plus susceptibles de développer des maladies diarrhéiques et respiratoires. La cryptosporidiose fait partie intégrante des maladies étudiées dans ce projet, en raison de sa prévalence et de son impact économique.

Les huit partenaires participant au projet HealthyCalf sont : l'Institut national de la recherche agronomique -Infectiologie et Santé Publique (INRA-ISP), l'INRA - Virologie et Immunologie Moléculaires (INRA-VIM), ALLICE, le GDS - Bretagne, l'Unité Expérimentale du Pin (UE du Pin), l'Unité Mixte de Recherche INRA-Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 1225 (UMR INRA-ENVT 1225), le Centre National de référence sur la *Cryptosporidium* (CNR Cryptosporidioses) et l'INRA - Génétique animale et biologie intégrative (INRA-GABI).

Une des étapes de ce projet est la réalisation de prélèvements de fèces, réalisée sur 3 campagnes (de 2018 à 2021) par des étudiants de l'ENVT, chez les veaux et leurs mères au sein des élevages à risque de Prim'Holstein et de Charolais. J'ai participé avec une camarade, Coline Méchin, à la 3^e campagne de prélèvements entre novembre 2020 et Février 2021.

Le CNR Cryptosporidioses travaille pour le projet HealthyCalf sur les facteurs de risques de cryptosporidiose chez les bovins. C'est dans le cadre de cette étude que s'inscrit ma thèse.

L'objectif était de rechercher et d'identifier au sein des élevages bretons prélevés les facteurs de risque associés à la cryptosporidiose chez les veaux nouveau-nés.

B. Matériel et Méthodes

a. Choix des élevages

L'objectif était de choisir des élevages ayant un historique de fort taux de mortalité des veaux (au-dessus de 20 %) ou ayant présenté une surmortalité ou morbidité importante en relation avec une maladie diarrhéique sur l'espace d'un mois en automne et hiver de l'année précédant la campagne. Ainsi, pour commencer, il a fallu définir le type d'élevage pouvant participer à l'étude :

- Elevages de bovins de race Prim'Holstein ou Charolaise (seulement Prim'Holstein pour la dernière campagne) ;
- Appartenant à un programme de filiation ;
- Taux de mortalité et de morbidité important chez les veaux ;
- Zone géographique : Centre Bretagne de préférence (*Figure 10*) ;
- Si possible, ayant un historique de problème diarrhéique chez les veaux nouveau-nés.



Figure 10 : carte de la Bretagne obtenue sur le site de l'académie de Rennes
Ovale : Zone géographique recherchée pour les prélèvements

b. Choix des animaux

La sélection des élevages, conjointement avec le GDS-Bretagne, a été réalisée en plusieurs étapes, avec diverses méthodes. Un premier contact a eu lieu en envoyant un tract explicatif simple du projet (*Annexe 1*) en 2018 à une liste de diffusion d'éleveurs de Prim'Holstein et de Charolais des départements Côtes-d'Armor (22), Finistère (29), Morbihan (56) et Ille-et-Vilaine (35). En parallèle les étudiantes de la première campagne ont rencontré les vétérinaires du GTV et les conseillers du GDS-Bretagne. Lors d'une réunion au GDS, une représentante d'Healthy Calf a expliqué les objectifs du projet et a donné aux différentes personnes intéressées une fiche d'information plus détaillée (*Annexe 2*). En se servant du système Sanael (outil en ligne de communication privée entre les éleveurs et le GDS) elles ont également réalisé une liste d'élevage à risque en utilisant l'interface enregistrant la mortalité au sein de ceux-ci. Les années suivantes des méthodes de recrutement similaires ont été utilisées (majoritairement grâce aux vétérinaires nous signalant des élevages ayant des soucis de diarrhées récurrents).

Une fois les élevages intéressants et intéressés sélectionnés, via les différentes méthodes précédemment citées, il a fallu vérifier leur compatibilité avec le projet, comme vu précédemment (faisant partie d'un programme de filiation...).

Après vérification des critères les élevages étaient inclus dans l'étude. La première campagne a ainsi effectué des prélèvements dans 13 élevages différents (dont seulement 2 charolais). La deuxième campagne a réalisé des prélèvements dans 26 élevages différents (dont seulement 3 charolais et 1 élevage de croisés). La troisième campagne a réalisé des prélèvements dans 11 élevages différents (tous des élevages de Prim'Holstein).

c. Prélèvements des échantillons

Plusieurs protocoles de prélèvements ont été appliqués selon les campagnes.

i. Première et deuxième campagnes :

Les éleveurs contactaient les étudiantes lorsqu'ils observaient que des veaux de 2 à 15 jours de vie présentaient des signes cliniques digestifs de type diarrhée, d'évolution aiguë (<3/4 jours). A la suite de cet appel, les étudiantes se déplaçaient dans l'élevage et des prélèvements de fèces étaient réalisés sur le ou les veaux malades répondant aux critères d'inclusion et sur tous les veaux de 2 à 15 jours d'âge, sains, vivant à proximité du ou des veaux malades. Des

prélèvements de fèces des mères de tous les veaux prélevés étaient également réalisés le même jour. Les prélèvements de fèces étaient réalisés avec des gants en latex au niveau du rectum des animaux. Les matières fécales étaient ensuite déposées dans un flacon stérile. Chaque flacon était identifié grâce à une étiquette dédiée à l'animal prélevé. Le numéro des veaux et des mères étant trop long pour être mis entièrement sur une étiquette, une nouvelle version de numérotation a été créée. Les veaux prélevés se voyaient attribués un chiffre entre 1 et 500 alors que le nouveau numéro des mères prélevées étaient compris entre 501 et 900. Une fiche de correspondance entre le nouveau numéro et le numéro d'identification officiel (à 10 chiffres) d'un animal prélevé était mise à jour au fur et à mesure de la réalisation des prélèvements. Cette fiche a été envoyée aux différentes équipes pour un bon suivi de l'identification des prélèvements. Sur cette fiche figurait également l'état de santé du veau déterminé par un examen clinique (appétit, comportement, fèces, réflexe de succion, pli de peau, position du globe oculaire) le jour du prélèvement. Un suivi clinique des veaux étaient également réalisé pendant 7 jours à la suite du prélèvement par l'éleveur en reprenant les mêmes critères d'évaluation clinique que les étudiantes (*Annexe 3*). (Chapuy 2019)

ii. Troisième campagne de prélèvements :

Lors de cette troisième campagne deux protocoles de prélèvements ont été réalisés successivement. De manière générale des tournées bi-hebdomadaires étaient prévues dans chaque élevage de l'étude (9 inclus en début d'étude). Avec une première visite hebdomadaire pour prélever les animaux et faire un premier suivi clinique, puis une deuxième visite 3 jours plus tard afin de réaliser un deuxième suivi clinique ; le dernier suivi clinique était réalisé la semaine d'après. Début janvier à la suite d'un bilan avec l'équipe de recherche il a été décidé d'arrêter les prélèvements dans un des élevages et d'en inclure 2 nouveaux.

1. Protocole suivi de novembre 2020 au 10 décembre 2020 :

Les veaux, âgés de 4 à 15 jours lors de la première visite, étaient prélevés en fèces seulement si on observait des signes cliniques digestifs de type diarrhée lors de la première visite hebdomadaire ou dans les 7 jours suivants celles-ci. Les veaux non symptomatiques mais présents au moment de l'observation de veaux symptomatiques étaient également prélevés. Les prélèvements de fèces étaient réalisés avec des gants en latex au niveau du rectum des animaux. Les matières fécales étaient ensuite déposées dans un flacon stérile. Chaque flacon était identifié

au marqueur indélébile. Les veaux prélevés se voyaient attribués un chiffre entre 001 et 220 alors que les mères prélevées étaient identifiées par leurs numéros de travail (à 4 chiffres) et en cas de doublon un code spécifique était inventé de manière individuelle. Un fichier excel de correspondance entre le nouveau numéro et le numéro d'identification officiel (à 10 chiffres) d'un animal prélevé était mis à jour au fur et à mesure de la réalisation des prélèvements. Ce fichier a été envoyé aux différentes équipes pour un bon suivi de l'identification des prélèvements. Sur ce fichier figurait également l'état de santé du veau déterminé par un examen clinique (température, appétit, comportement, fèces, réflexe de succion, pli de peau, position du globe oculaire) que nous réalisons le jour du prélèvement, 3 jours plus tard et 7 jours après le prélèvement (*Annexe 4*).

2. Protocole suivi du 10 décembre 2020 à février 2021 :

Par rapport au premier protocole le seul changement était que les veaux âgés de 4 à 15 jours étaient systématiquement prélevés lors de la première visite de la semaine dans l'élevage, qu'ils soient symptomatiques ou non.

Les prélèvements réalisés ont été stockés à +4°C au laboratoire LABOCEA de Quimper, d'où ils étaient expédiés régulièrement au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen pour réaliser la spéciation et le génotypage de *Cryptosporidium*.

d. Analyses des prélèvements

i. Sur le terrain : Kit Speed V-Diar 5™

Lors du prélèvement de fèces des veaux un test était normalement réalisé à l'aide du kit Speed V-Diar 5™ (test immunochromatographie rapide produit par Virbac, France) Ce kit détecte la présence d'antigènes des cinq agents pathogènes suivants : Coronavirus, Rotavirus, *C. parvum*, *E. coli* F5 et *E. coli* cs31A. En effet chaque bandelette (au nombre de 5) présente des anticorps spécifiques à un de ces agents pathogènes. Ceux-ci vont se lier aux antigènes éventuellement présents dans l'échantillon. Les fèces (en très petite quantité) sont mélangées à un réactif présent dans le bas du dispositif (où se situent les extrémités des bandelettes) (*Figure 11*). Le complexe antigène – anticorps, qui se forme lors de la présence du pathogène recherché, va alors migrer par capillarité et s'arrêter par fixation à des anticorps spécifiques présents sur la membrane, pour former une bande colorée. Le mélange continue de migrer jusqu'à l'autre extrémité de la bandelette et forme une deuxième bande colorée qui permet de confirmer la

validité du test (témoin positif). Si cette bande n'apparaît pas, le test n'est pas valide (Virbac, 2019). La lecture du test a lieu 15 minutes après le mélange réactif – fèces dans le dispositif.

Protocole d'utilisation Speed V-Diar™

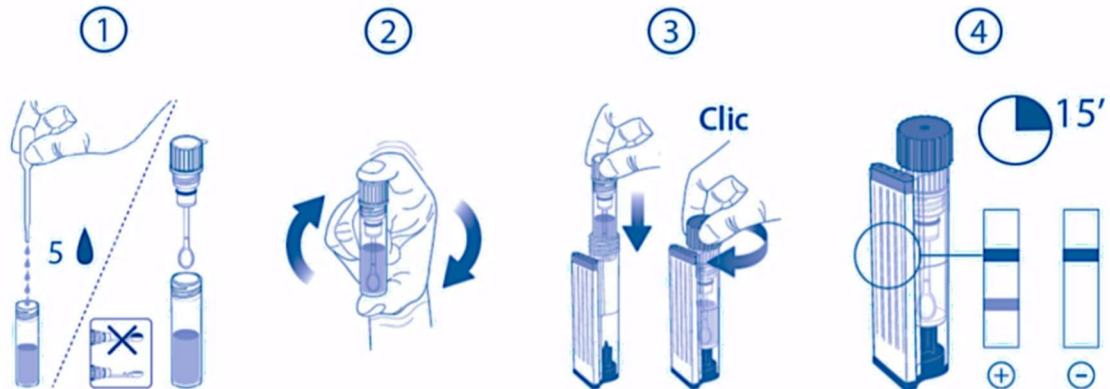


Figure 11 : Notice d'utilisation du test Speed V Diar 5™ (Virbac 2019)

Ce test a une sensibilité et une spécificité différente selon l'agent pathogène recherché (Tableau 1).

Tableau 1 : Sensibilité et spécificité du kit Speed V Diar 5™ (Virbac 2019)

	Sensibilité	Spécificité
Rotavirus	93,5%	100%
Coronavirus	94,3%	99,2%
<i>C. parvum</i>	97,2%	95%
E. coli F5	93,5%	99,2%
E. coli cs31A	89%	93%

ii. En laboratoire : PCR nichée

Les échantillons de fèces sont tous stockés à 4°C pour la bonne conservation des oocystes. L'extraction d'ADN a été réalisée sur une prise d'essai de 200 µL de fèces à l'aide du kit réactif Power fecal (QIAGEN, Hilden, Allemagne) adapté à l'extraction d'ADN dans les fèces et conformément au protocole recommandé par le fabricant. Les ADN extraits ont ensuite été conservés à -20°C avant utilisation.

La caractérisation de *Cryptosporidium* spp. passe essentiellement par: la spéciation, qui permet d'identifier les différentes espèces ; le génotypage ou sous-typage permettant d'observer différentes populations génétiques au sein d'une même espèce en ciblant le gène

GP60. La caractérisation a été réalisée par le CNR Cryptosporidiose au CHU de Rouen. Pour cela ils ont réalisé une PCR nichée : PCR en deux étapes successives, avec deux couples d'amorces différentes, le second liant des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon. Cette technique est utilisée pour réduire le risque de contamination (le produit final doit pouvoir interagir avec deux couples d'amorces, donc deux niveaux de spécificité). Elle permet aussi une meilleure sensibilité du résultat.

1. Séquençage par PCR 18S :

Cette méthode est la plus utilisée pour l'identification des espèces de *Cryptosporidium*. C'est une PCR qui a pour cible le gène codant pour la SSU ARNr car le génome de *Cryptosporidium* en contient un grand nombre de copies. La PCR primaire (~ 850 pb), a été réalisée en utilisant les amorces XF2 (5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3') et XR2 (5'-AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-3'), suivis d'une PCR secondaire (215 pb) utilisant des amorces pSSUf (5'-AAA GCT CGT AGT TGG ATT TCT GTT-3') et pSSUr (5'-ACC TCT GAC TGT TAA ATA CRA ATG C-3'). Pour la PCR primaire, le profil d'amplification consistait à : 94 ° C pendant 5 min (dénaturation initiale), suivi de 40 cycles de 94 ° C pendant 45 s (dénaturation), 45 ° C pendant 2 min (hybridation) et 72 ° C pendant 1,5 min (extension), avec une extension finale de 72 ° C pendant 10 min. Pour la PCR secondaire, le protocole était : 94 ° C pendant 5 min, suivi de 40 cycles de 94 ° C pendant 30 s, 55 ° C pendant 30 s et 72 ° C pendant 30 s, avec une extension finale de 72 ° C pendant 10 minutes. Les amplicons ont été traités individuellement avec ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), selon les instructions du fabricant, puis soumis à un séquençage automatique bidirectionnel (chimie BigDye® Terminator v.3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en utilisant les mêmes amorces utilisées dans la PCR secondaire. La qualité de la séquence (electrophoregramme) a été analysée et vérifiée à l'aide du programme 4peaks. Chaque séquence dérivée de SSU obtenue a été comparée par analyse BLASTn avec des données accessibles au public (GenBank).

2. Génotypage

L'un des gènes les plus étudiés et qui est devenu incontournable dans le génotypage de *Cryptosporidium* est le gène GP60. Le séquençage de la glycoprotéine 60kDa est utilisé fréquemment pour le sous-typage de *Cryptosporidium* du fait de l'hétérogénéité de ses

séquences et de son utilité dans la biologie du parasite. En effet, elle est située à la surface apicale des formes invasives du parasite et est une cible pour les anticorps chez les humains.

Le génotypage a été réalisé par séquençage d'un fragment du gène gp60. Les amorces AL3531 (5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3')/AL3533 (5'-GAGATATATCTTGGTGCG-3') ont été utilisées dans la PCR primaire et les amorces AL3532 (5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3')/LX0029 (5'-CGAACCACATTACAAATGAAGT-3') pour la PCR secondaire conduisant à l'amplification d'un fragment d'environ 364 pb. Chaque mélange réactionnel (volume total, 50 µl) contenait 5 µl de tampon DreamTaq 10X, chaque désoxynucléoside triphosphate à une concentration de 0,2 mM, chaque amorce à une concentration de 100 nM, 2,5 U de polymérase DreamTaq et 5 µl d'ADN. De plus, 1,25 µl de DMSO (100%) a été ajouté au mélange. L'amplification comprenait 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45 s, hybridation à 54°C pendant 45 s et élongation à 72°C pendant 1 min, ont été réalisés. Un démarrage à chaud initial à 94°C pendant 3 minutes et une étape d'extension finale à 72°C pendant 7 minutes ont également été inclus. Chaque série d'amplification comprenait un contrôle négatif (eau ppi) et deux contrôles positifs (ADN génomique d'oocystes purifiés de *C. parvum* (provenant de veaux infectés expérimentalement) et ADN génomique de *C. hominis* à partir d'un échantillon fécal collecté au CHU Rouen).

Le gène GP60 ciblé pour le sous-typage de *Cryptosporidium* spp., comporte à l'extrémité 5' des répétitions de trinuécléotides TCA, TCG ou TCT codant tous pour la sérine. Mais en plus des variations du nombre de répétitions de trinuécléotides, il contient également différentes séquences étendues, dans les régions non répétées. Ces différentes caractéristiques de GP60 ont permis de classer *Cryptosporidium* spp. en plusieurs familles de sous-types comme vu dans les premières parties de ce document.

e. Questionnaire

A l'aide de l'équipe du CNR Cryptosporidiose j'ai rédigé un questionnaire à soumettre aux éleveurs des différentes campagnes. Ce questionnaire (*Annexe 5*) permettait d'obtenir des informations sur l'organisation de l'élevage (type d'atelier, calendrier de vêlage, source d'eau...), la situation sanitaire de l'élevage, la gestion des vêlages et sur d'autres potentiels facteurs de risques. Une fois le questionnaire rédigé, j'ai effectué la liste de tous les élevages prélevés depuis le début de l'étude HealthyCalf. Pour cela j'ai récupéré les numéros de cheptel (EDE) des élevages sur les fichiers de synthèses des précédentes campagnes. Puis à l'aide du logiciel Sanael j'ai récupéré les coordonnées des éleveurs ainsi que certaines données telles que

la mortalité des veaux, des analyses d'eau effectués par le GDS, le nom du vétérinaire sanitaire, le statut sanitaire de l'élevage vis-à-vis du BVD et de la paratuberculose... J'ai ensuite contacté par téléphone tous les éleveurs dont j'avais réussi à trouver des coordonnées à jour afin de leur soumettre le questionnaire. J'ai ainsi réussi à récupérer les données pour 12 élevages de la première campagne (donnant 83 veaux prélevés), 17 élevages de la deuxième campagne (donnant 79 veaux prélevés) et 10 élevages de la dernière campagne (donnant 95 veaux prélevés). Sur ces données des trois campagnes, un total de 357 veaux prélevés a pu être inclus dans l'étude.

f. Mise en forme des données

Les données recueillies via le questionnaire et les résultats de la caractérisation moléculaire de *cryptosporidium* ont été mises en commun sous forme de tableur excel (*Annexe 6*) afin de permettre une homogénéisation des données et permettre l'analyse statistique des données. Certaines données des questionnaires n'ont pas été incluses dans le fichier excel car elles n'étaient pas prises en compte dans l'étude à plus grande échelle réalisée par le CNR Cryptosporidiose (réalisés sur tous les prélèvements fait dans le cadre d'HealthyCalf sur les mères et les veaux sur le terrain en Bretagne, ainsi que ceux à réalisés à l'UE du Pin).

g. Analyse statistique

Lorsqu'une variable présentait une distribution normale, elle était donnée avec sa moyenne et sa déviation standard. Lorsque la distribution n'était pas normale, la variable était notée avec sa médiane et les espaces interquartiles (EI) : 25ème et 75ème percentiles (p25 et p75).

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (version 3.6.0) L'analyse bivariée de deux variables qualitatives s'est faite au moyen d'un test de Chi2. La comparaison d'une variable qualitative avec une variable quantitative a été réalisée par un test non paramétrique de Mann-Whitney/ Wilcoxon.

Les résultats sont représentés par des graphiques en boîtes à moustaches. La valeur centrale du graphique est la médiane (il existe autant de valeurs supérieures qu'inférieures à cette valeur dans l'échantillon). Les bords du rectangle sont les quartiles (Pour le bord inférieur, un quart des observations ont des valeurs plus petites et trois quart ont des valeurs plus grandes, le bord supérieur suit le même raisonnement). Les extrémités des moustaches sont calculées en utilisant 1.5 fois l'espace interquartile (la distance entre le 1er et le 3ème quartile). Les valeurs

à l'extérieur des moustaches sont représentées par des points. On ne peut pas dire que si une observation est à l'extérieur des moustaches alors elle est une valeur aberrante.

L'analyse multivariée s'est faite par un modèle de régression logistique après ajustement sur les facteurs de confusion potentiels pour obtenir les facteurs indépendamment associés au portage de *Cryptosporidium*. Les variables étaient considérées comme facteurs de confusion potentiels lorsque l'analyse bivariée retrouvait un $p < 0.10$. Un $p < 0.05$ était considéré comme statistiquement significatif.

C. Résultats

a. Résultats de la recherche de *cryptosporidium* par test immunologiques dans les fèces

318 prélèvements de fèces de veaux ont eu une analyse par le test rapide Speed V Diar 5TM. Sur ces 318 tests *C. parvum* a été identifié 135 fois, E. coli cs31A 22 fois, E.coli F5 10 fois, coronavirus 24 fois, et rotavirus 79 fois (*Figure 12*). Nous observons plusieurs types de profil d'infections avec les tests SpeedVDiar (*Figure 13*). Le profil majoritaire identifié est *C. parvum* seul (25% des tests). On retrouve ensuite les infections à rotavirus seul (11%), suivi de peu par les co-infections rotavirus/*C. parvum* (9%). D'autres profils de co-infections ont été identifiés mais sont minoritaires.

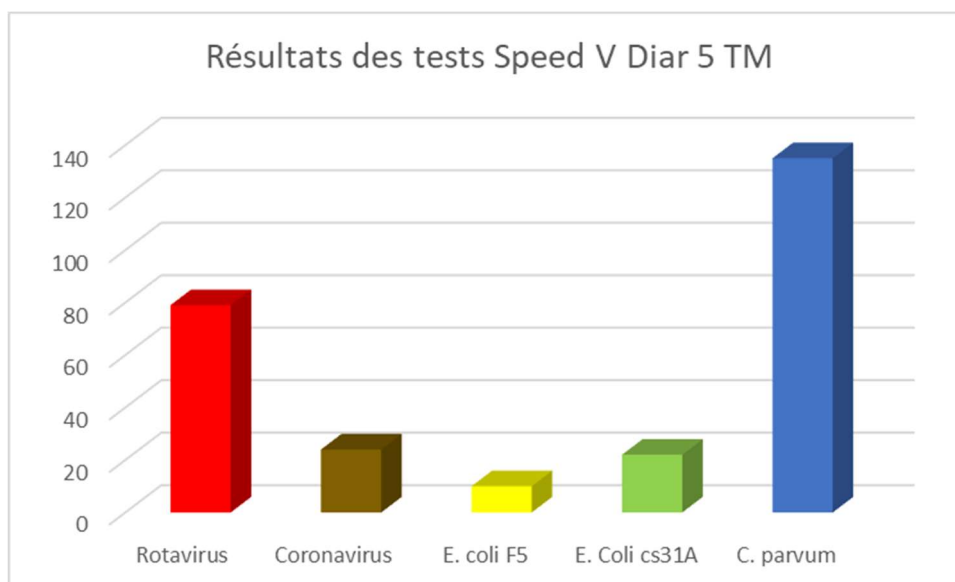


Figure 12 : Graphique représentant le nombre de test positifs pour chaque agent pathogène recherché par le kit speed V Diar 5TM

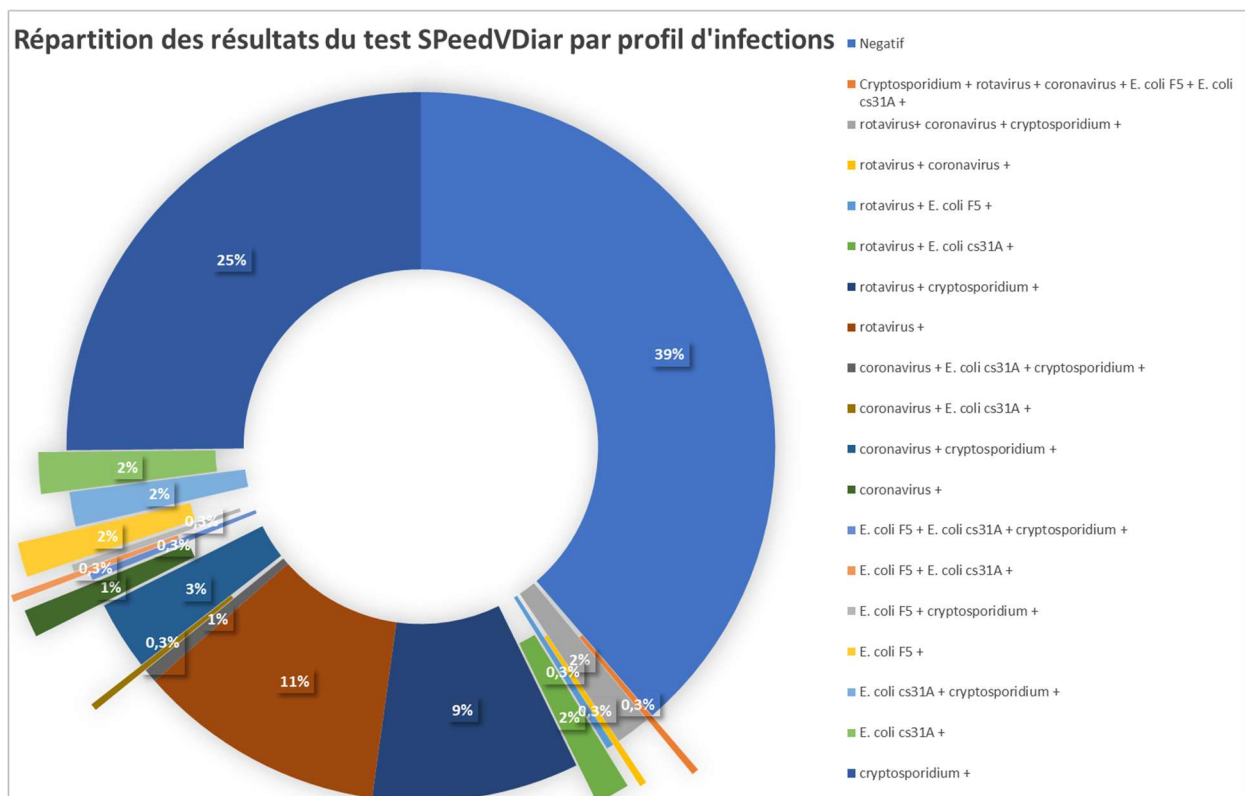


Figure 13 : Graphique représentant les différents profile d'infections et co-infections identifiés par le kit Speed V Diar 5 TM

b. Résultats de la recherche de *cryptosporidium* par PCR dans les fèces

Lors de la première campagne de prélèvements (2018-2019) 74 prélèvements ont été analysés et 53 ce sont révélés positifs à *Cryptosporidium* (Table 1). Sur cette campagne le pourcentage de veaux malades (ayant présenté des signes digestifs) par rapport au nombre de veaux nés sur la période de prélèvements est d'environ 8%, et le pourcentage de veaux positif à la cryptoridiose est de 11% (nombre de PCR positive à *Cryptosporidium* sur le nombre de vèlages ayant eu lieu pendant la période de prélèvements). Chez 77% de ces veaux positifs le *Cryptosporidium* identifié est *C. parvum* sous type : IIaA15G2R1.

Lors de la deuxième campagne de prélèvements (2019-2020) 73 prélèvements ont été analysés et 61 ce sont révélés positifs à *Cryptosporidium* (Table 1). Sur cette campagne le pourcentage de veaux positif à la cryptoridiose par rapport au nombre de veaux nés sur la

période de prélèvements est d'environ 9,5%. Chez 62% de ces veaux positifs le *Cryptosporidium* identifié est *C. parvum* sous type : IlaA15G2R1.

Lors de la troisième campagne de prélèvements (2020-2021) 192 prélèvements ont été analysés et 120 ce sont révélés positifs à *Cryptosporidium* (Table 1). Sur cette campagne le pourcentage de veaux malades (ayant présenté des signes digestifs) par rapport au nombre de veaux nés sur la période de prélèvements est d'environ 29%, et le pourcentage de veaux positif à la cryptosporidiose est de 31%. Chez 84% de ces veaux positifs le *Cryptosporidium* identifié est *C. parvum* sous type : IlaA15G2R1.

Il est intéressant de noter que sur la totalité des 3 campagnes, en plus de *C. parvum* sous type : IlaA15G2R1, *C. bovis* a été identifié 4 fois, *C. andersoni* 2 fois, *C. meleagridis* 1 fois, *C. erinacei* 1 fois, *C. parvum* sous-type IIdA18G1 1 fois, *C. parvum* sous-type IlaA19G1R1 2 fois, *C. parvum* sous-type IIdAA17G1 1 fois, et *C. parvum* sous-type IlaA14G1R1 1 fois (Table 1).

On retrouve une prévalence moyenne de la cryptosporidiose sur les 3 campagnes de 15%.

Table 1 : Résultats de la recherche et identification de *Cryptosporidium* par PCR au sein des prélèvements de fèces des 3 campagnes de prélèvements (2018 à 2021)

	Campagne 2020-2021	Campagne 2019-2020	Campagne 2018-2019	Total
nb prelevements	192	73	74	339
nb veaux malades	114	NA	37	NA
nb de vêlages	386	645	482	1513
nb positifs crypto	120	61	53	234
IlaA15G2R1	101	38	41	180
C. bovis	1	3	0	4
C. andersoni	0	2	0	2
IIdA18G1	1	0	0	1
C. meleagridis	1	0	0	1
IlaA19G1R1	0	2	0	2
IIdAA17G1	0	1	0	1
IlaA14G1R1	0	1	0	1
C. erinacei	0	0	1	1
non identifiable	17	14	12	43

On observe une prévalence variant entre 3,45% et 32,10% entre les différents élevages lors de la première campagne de prélèvements. Le pourcentage de veaux malades au moment du prélèvement varie également entre les différents élevages (entre 0% et 25,93%). (Table 2)

Table 2 : Résultats de la première campagne de prélèvements (2018-2019)

Elevage	Nombre de vèlage	Nombre de veaux malades	Nombre de veaux prélevés	Nombres de veaux positifs à <i>Cryptosporidium</i>	Pourcentage de veaux malades	Prévalence de <i>Cryptosporidium</i>	Pourcentage de veaux Crypto + sur le nombre de veaux prélevés
1	87	1	6	3	1,15%	3,45%	50,00%
2	81	21	36	26	25,93%	32,10%	72,22%
3	17	1	2	1	5,88%	5,88%	50,00%
4	47	5	9	4	10,64%	8,51%	44,44%
5	61	0	4	2	0,00%	3,28%	50,00%
6	66	1	3	3	1,52%	4,55%	100,00%
7	43	4	7	7	9,30%	16,28%	100,00%
8	40	0	3	3	0,00%	7,50%	100,00%
9	40	4	4	4	10,00%	10,00%	100,00%

Lors de la deuxième campagne de prélèvements la prévalence de *Cryptosporidium* varie entre 2,44% et 30%. (Table 3)

Table 3: Résultats de la deuxième campagne de prélèvements (2019-2020)

Elevage	Nombre de vèlage	Nombre de veaux prélevés	Nombres de veaux positifs à <i>Cryptosporidium</i>	Prévalence de <i>Cryptosporidium</i>	Pourcentage de veaux positifs à <i>Cryptosporidium</i> sur le nombre de veaux prélevés
1	20	5	5	25,00%	100,00%
2	103	5	4	3,88%	80,00%
3	18	2	1	5,56%	50,00%
4	118	15	15	12,71%	100,00%
5	37	2	2	5,41%	100,00%
6	10	5	3	30,00%	60,00%
7	82	2	2	2,44%	100,00%
8	55	5	4	7,27%	80,00%
9	52	10	5	9,62%	50,00%
10	66	3	3	4,55%	100,00%
11	14	3	2	14,29%	66,67%
12	50	13	13	26,00%	100,00%
13	20	3	2	10,00%	66,67%

Lors de la dernière campagne le pourcentage de veaux malades lors des prélèvements varie entre 12% et 100%. Tandis que la prévalence de *Cryptosporidium* varie elle entre 13,51% et 100%. (Table 4)

Table 4 : Résultats de la troisième campagne de prélèvements (2020-2021)

Eleavage	Nombre de vêlage	Nombre de veaux malades	Nombre de veaux prélevés	Nombres de veaux positifs à <i>Cryptosporidium</i>	Pourcentage de veaux malades	Prévalence de <i>Cryptosporidium</i>	Pourcentage de veaux positifs à <i>Cryptosporidium</i> sur le nombre de veaux prélevés
1	67	33	49	30	49,25%	44,78%	61,22%
2	31	9	10	9	29,03%	29,03%	90,00%
3	37	6	16	5	16,22%	13,51%	31,25%
4	38	9	20	16	23,68%	42,11%	80,00%
5	56	18	20	12	32,14%	21,43%	60,00%
6	39	11	26	16	28,21%	41,03%	61,54%
7	50	6	18	8	12,00%	16,00%	44,44%
8	43	16	27	18	37,21%	41,86%	66,67%
9	4	4	4	4	100,00%	100,00%	100,00%
10	2	2	2	2	100,00%	100,00%	100,00%

c. Résultats de l'analyse statistique des facteurs de risque

i. Nature des facteurs de risques recherchés

Lors de la réalisation du questionnaire nous nous sommes intéressés à plusieurs facteurs :

- la race (Prim'holstein vs charolais) ;
- le nombre de vêlage ;
- les traitements prophylactiques ;
- l'historique de l'élevage ;
- le statut BVD du troupeau ;
- le statut paratuberculose du troupeau ;
- le logement des veaux ;
- l'abreuvement et la distribution du lait ;
- les conditions de vêlage ;
- les achats de nouveaux animaux et mise en quarantaine ;
- le colostrum

- la complémentation en oligo-éléments des mères dans le dernier tiers de gestation ;
- la complémentation des jeunes veaux en oligo-éléments ;
- la présence d'autres animaux sur le site ;
- et la proximité d'autres élevages.

Nous avons choisi d'étudier ces facteurs car certains peuvent être assez facilement modifiés en changeant la conduite d'élevage (conditions de vêlage, colostrum, logement des veaux, achats d'animaux et quarantaine, complémentation en oligo-éléments...), mais aussi car certains sont décrits dans d'autres études comme jouant possiblement un rôle dans la cryptosporidiose (race, nombre de vêlages, historique de l'élevage, statut sanitaire du troupeau...). Au sein de ces facteurs certains nous ont paru plus importants que d'autres. C'est le cas notamment du colostrum, de l'abreuvement, des conditions de vêlage, et des traitements prophylactiques. En effet la plupart de ces facteurs sont décrits comme nécessitant plus d'études dans la meta-analyse de Brainard en 2020 (Brainard et al. 2020).

Certains facteurs initialement inclus dans l'étude ont dû être exclus du fait des faibles réponses des éleveurs sur ces catégories du questionnaire. C'est le cas des antécédents de diarrhée et de problèmes respiratoires au sein des élevages, en effet peu, voir aucun éleveur n'avait pas la capacité de donner le nombre de veaux atteints l'année d'avant de diarrhée/problèmes respiratoires en précisant les tranches d'âges. Les autres catégories du questionnaire ont globalement été bien répondues. Une des limites du questionnaire était l'interrogation sur la propreté des infrastructures (zones d'abreuvements et cases de vêlage), car les éleveurs n'ont pas forcément tous le même référentiel de propreté, ainsi cette catégorie n'a été remplie que pour les élevages où j'ai pu juger personnellement de la propreté afin de limiter les biais. Une autre question du questionnaire qui a posé un problème est le temps entre le vêlage et la première tétée, en effet quand le vêlage a lieu la nuit les éleveurs ne sont pas toujours là pour surveiller.

Il aurait été intéressant de réaliser ce questionnaire au moment des prélèvements de chaque campagne afin de limiter les biais au maximum et d'apporter plus de précisions aux réponses. En effet cela aurait permis d'ajuster le questionnaire à chaque veau notamment par rapport aux conditions de vêlage (vêlage au pré, ou au bâtiment, combien de temps avant le vêlage la mère a-t-elle été séparée du troupeau, vêlage assisté ou non...) et aux conditions de densité animale (combien de vêlages ont eu lieu la même semaine, combien de veaux sont présents à ce moment...).

L'étude de l'importance de ces différents facteurs est en cours. Une statisticienne épidémiologiste du CNR *Cryptosporidium* réalise l'analyse des données récoltées. Pour l'instant seuls trois facteurs ont pu être analysés. Ils seront présentés dans les prochains paragraphes.

ii. Facteur traitement prophylaxie

Pour le facteur « traitement prophylactique » les réponses possibles au questionnaire étaient :

- j'utilise des vaccins contre des agents de diarrhée ;
- j'utilise des traitements pour la coccidiose ;
- j'utilise des traitements pour la coccidiose mais seulement à base d'huiles essentielles ;
- j'utilise des traitements contre la Cryptosporidiose ;
- et je n'utilise aucun traitement prophylactique.

Dans les élevages n'utilisant aucun traitement prophylactique le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose est de 18%. Le fait d'utiliser des vaccins contre les agents de diarrhée ferait baisser ce pourcentage de 0,4%, l'utilisation de traitement contre la cryptosporidiose le ferait baisser de 3%, l'utilisation d'huiles essentielles contre la coccidiose le ferait baisser de 2%. Dans ces trois conditions la baisse n'est pas significative statistiquement. L'utilisation de traitements prophylactiques contre la cryptosporidiose ferait baisser le pourcentage de veaux positifs de 3% environ, mais la baisse n'est, là encore, pas significative. (Table 5)

Cela signifie que le facteur « traitement prophylactique » n'apparaît pas comme un facteur de risque de la cryptosporidiose.

Table 5 : Résultats de l'analyse multivariée du facteur traitement prophylactique sur le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose par PCR

% veaux crypto	Estimate	Std Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.181534	0.041830	4.340	0.000192 ***
Diarrheesoui	-0.004086	0.073690	-0.055	0.956202
coccidioseoui	-0.031746	0.060168	-0.528	0.602235
coccidioseoui (huiles essentiels)	-0.023602	0.173516	-0.136	0.892853
Cryptosporidioseoui	-0.034231	0.062383	-0.549	0.587874

iii. Facteur administration du colostrum

Pour le facteur « administration du colostrum » les réponses possibles au questionnaire étaient :

- j'administre le colostrum au seau ;
- j'administre le colostrum par sondage ;
- j'administre le colostrum en laissant le veau téter sa mère ;
- et j'administre le colostrum au biberon.

Dans les élevages dont l'administration du colostrum se faisait au biberon le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose est de 27%. Le fait d'administrer le colostrum au seau ferait baisser ce pourcentage de 10%, mais cette baisse n'est pas significative. L'administration du colostrum par sondage ferait baisser significativement le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose de 19%. Et l'administration du colostrum par tétée le ferait baisser significativement de 17%. (Table 6)

Cela signifie que le facteur « administration du colostrum » apparait ici comme un facteur de prévention de la cryptosporidiose.

Table 6 : Résultats de l'analyse multivariée du facteur administration du colostrum sur le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose par PCR

%veaux crypto	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.27141	0.06186	4.388	0.000158 ***
administrationColostrumseau	-0.10441	0.07279	-1.435	0.162899
administrationColostrumsondage	-0.19343	0.08375	-2.310	0.028797 *
administrationColostrumtetee	-0.16794	0.08099	-2.074	0.047777 *

iv. Facteur abreuvement

Pour le facteur « abreuvement » nous avons étudié :

- le lieu (abreuvements en buvettes ; lieu d'abreuvement collectifs, abreuvement au seau, abreuvoirs) ;
- la source de l'eau (forage, puits de surface, réseau potable) ;
- le traitement de l'eau (oui ou non) ;

- et la propreté des abreuvoirs (moyenne, propre ou sale).

Le fait d'avoir des buvettes comme lieu d'abreuvement ferait augmenter non significativement de 16% le nombre de veaux positifs à la cryptosporidiose. Le fait d'avoir une source d'abreuvement collective ferait diminuer non significativement de 10% le nombre de veaux positifs à la cryptosporidiose. De même abreuver les veaux au seau le ferait diminuer non significativement de 0,3%. Et le fait d'avoir un forage comme source d'eau le ferait augmenter non significativement de 4%. Le fait d'avoir un puit de surface comme source d'eau ferait diminuer non significativement de 8% le nombre de veaux positifs à la cryptosporidiose. Le fait de traiter l'eau (traitement au chlore ou autre) le ferait augmenter non significativement de 10%. Le fait d'avoir un lieu d'abreuvement propre ferait diminuer non significativement de 10% le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose, et le fait d'avoir des abreuvoirs sales le ferait diminuer non significativement de 8% (Table 7).

Cela signifie que le facteur « abreuvement » n'apparaît pas ici comme un facteur de risque de la cryptosporidiose.

Table 7 : Résultats de l'analyse multivariée du facteur abreuvements sur le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose par PCR

%veaux crypto	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.176086	0.400999	0.439	0.676
lieuAbvtbuvettes	0.157248	0.453285	0.347	0.741
lieuAbvtCOLLECTIVE	-0.105263	0.298887	-0.352	0.737
lieuAbvtseau	-0.003364	0.250067	-0.013	0.990
sourceAbvtforage	0.035175	0.359908	0.098	0.925
sourceAbvtpuits de surface	-0.076568	0.306268	-0.250	0.811
traitementAbvtoui	0.107039	0.200500	0.534	0.613
PropreteAbreuvoirspropre	-0.101293	0.163707	-0.619	0.559
PropreteAbreuvirssale	-0.084145	0.200500	-0.420	0.689

D. Discussion

Au cours de notre étude nous avons observé que la prévalence (pourcentage de veaux positifs à *Cryptosporidium* par PCR par rapport au nombre de vêlage sur la période) de *Cryptosporidium* était comprise entre 3% et 100% selon les élevages et les années. La prévalence moyenne de la première campagne était de 11% (variant entre 4% et 32% selon les élevages), celle de la deuxième année était de 9,5% (variant entre 3% et 30%) et celle de la troisième année était de 31% (variant entre 13% et 100%).

La fréquence (nombre de veaux positifs par PCR à *Cryptosporidium* sur le nombre de veaux testés) elle, varie entre 31% et 100% selon les élevages et les années. Lors de la première campagne elle atteint une moyenne de 72% (variant entre 44% et 100% selon les élevages). Lors la deuxième campagne elle varie entre 50% et 100% selon les élevages avec une moyenne de 84%. Et lors de la troisième campagne la fréquence varie entre 31% et 100% avec une moyenne de 62,5%. Ces résultats sont en corrélation avec d'autres études réalisées en France précédemment (Rieux et al. 2014; Mammeri et al. 2019; Lefay et al. 2000). Cela vient renforcer le statut de maladie endémique pour la cryptosporidiose en France et notamment en élevages laitiers bretons.

La fréquence (nombre de veaux positifs à *C. parvum* par le test Speed V Diar 5TM sur le nombre de veaux testés) moyenne sur les 3 campagnes est de 43%. Et *C. parvum* est le pathogène majoritairement identifié au sein des prélèvements (dans 135 des 318 prélèvements testés) par tests immunologiques.

On observe une différence de fréquence moyenne entre l'identification par PCR (68%) et l'identification par tests immunochromatographiques (43%). En effet sur 314 échantillons de fèces ayant été testés par PCR et par test Speed V Diar 5TM, seulement 108 ont été identifiés comme positifs par les 2 tests (correspondant à 34% des échantillons). 24% ont été identifiés comme négatifs par les deux méthodes d'analyses. 8% de ces prélèvements ont été identifiés comme positifs par immunochromatographie et négatifs par PCR ; tandis que 34% ont été identifiés négatifs par immunochromatographie et positifs par PCR. Ces différences peuvent tout d'abord s'expliquer par le fait que le test immunochromatographique utilisé recherche seulement *C. parvum* parmi les *cryptosporidium*. Cette différence s'explique également par les différences de sensibilité et de spécificité de ces deux méthodes d'identification.

Cependant ces résultats ont pu être surévalués par le protocole de prélèvement. En effet le programme HealthyCalf cible des élevages avec un historique de problème de diarrhées chez les veaux nouveau-nés, donc plus probablement atteints de cryptosporidiose. Par ailleurs cette

étude n'incluait que les veaux de pur race charolais ou Prim'Holstein. Cela a réduit le nombre de veaux prélevés et entraîné un biais sur la prévalence calculée puisque dans le nombre calculé de vêlages par élevage, les veaux croisés étaient inclus alors que non prélevés. Finalement la mort de certains veaux de suite de diarrhées avant de pouvoir les prélever, aurait aussi pu biaiser le résultat final. Toutefois ce n'est que rarement arrivé dans notre étude. En conclusion il est donc difficile d'estimer la réelle fréquence des élevages bretons infectés. Par contre notre étude confirme la forte fréquence d'infection par *Cryptosporidium* parmi les veaux diarrhéiques, comme cela avait déjà été abordé (Alzieu et al. 2012). Ces résultats viennent soutenir le fait que *Cryptosporidium* est un parasite commun des veaux nouveau-nés lors de diarrhée en Bretagne. Toutefois nous n'avons pas fait le lien direct entre la présence du parasite chez le veau et l'apparition de diarrhée, notamment car nous n'avons pas investi des élevages cliniquement sains (absence de diarrhées).

Nous avons observé une différence de la fréquence moyenne de détection de *cryptosporidium* entre les différentes campagnes. Cette différence reflète probablement et en partie les différences de protocole qui ont successivement été utilisés. Lors des deux premières campagnes les étudiantes se déplaçaient pour prélever seulement quand les éleveurs les appelaient, ce qui implique une bonne observation de ces veaux par l'éleveur et d'être sûr que l'éleveur appelle à chaque fois et rapidement. Alors que lors de la dernière campagne les prélèvements étaient inscrits dans le cadre d'une tournée bi-hebdomadaire chez les éleveurs ce qui nous permettait de détecter plus rapidement et plus facilement les veaux malades, et les éleveurs nous appelaient en plus s'ils observaient entre nos deux visites de nouveaux malades (qui étaient donc prélevés au prochain passage ou le jour même selon l'organisation des tournées). Le fait d'organiser des tournées dans les élevages chaque semaine a ainsi permis d'augmenter le nombre de veaux prélevés par élevage par rapport aux années précédentes. Cela se ressent sur la prévalence qui est nettement plus forte pour la troisième campagne par rapport aux deux précédentes.

Notre étude a concerné 339 veaux prélevés (total des prélèvements analysables) dans 25 élevages différents dont 1 élevage ayant participé aux 3 campagnes et 5 élevages ayant participé à 2 campagnes. Le faible nombre d'élevages prélevés peut s'expliquer par les critères d'inclusion (élevages trop excentrés, élevages n'appartenant pas à un programme de filiation génétique...) et le faible intérêt des éleveurs pour cette étude. En effet les éleveurs n'avaient pas suffisamment de temps pour nous en accorder, où la mise en place des prélèvements étaient trop contraignante pour eux...

L'analyse statistique pour déterminer l'importance des facteurs inclus dans notre étude sur la cryptosporidiose étant en cours, nous n'avons que peu de données à discuter. L'administration correcte du colostrum apparaît cependant comme un potentiel facteur de prévention de la cryptosporidiose. Notamment l'administration de celui-ci par tétée ou par sondage apparaît ici comme protecteur en permettant une baisse significative de 17% et 19% respectivement du pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose par rapport à une administration du colostrum au biberon. Nous n'avons pas d'explications claires sur ces résultats. Le sondage permet d'administrer rapidement la quantité de colostrum nécessaire dans les premières heures de vie, ce qui n'est pas forcément facile lors d'administration au biberon. Il aurait été intéressant de connaître les quantités bues lors d'ingestion par biberon. Par ailleurs les veaux qui tètent à la mamelle sont ceux qui sont probablement les plus vifs à la naissance et qui vont donc directement à la mère, les veaux nourris au biberon étant probablement plus faibles. Les deux autres facteurs analysés dans notre étude (abreuvement et traitements prophylactiques) n'apparaissent pas comme des facteurs de risque ou de prévention de la cryptosporidiose puisqu'ils ne font pas varier de manière significative le pourcentage de veaux positifs à la cryptosporidiose. L'analyse du facteur abreuvements donne des résultats surprenants voir incohérents (diminution du nombre de veaux positifs à *Cryptosporidium* lorsque les abreuvoirs sont sales par exemple). Après vérification ces résultats étaient dûs à une mauvaise transcription des données originales vers la matrice d'analyses. En effet la plupart des éleveurs ont plusieurs types d'abreuvements possibles pour les veaux selon leur localisation (cases individuelles ou aires collectives...), or ces différences n'ont pas été retranscrites dans la matrice de données, entraînant des erreurs dans les calculs. Une seconde analyse plus rigoureuse des données est en cours.

Un des biais importants de l'analyse statistique multivariée de cette étude est le faible nombre de veaux prélevés et d'élevages différents par rapport au nombre élevé de facteurs à analyser. En effet, nous avons beaucoup de variables et peu d'observations au regard de ce nombre élevé de variables, donc il y a un risque de "sur-apprentissage", de "sur-coller" aux aléas d'échantillonnage des données. Il se peut également que certaines variables soient très corrélées entre elles, ce qui donne une structure compliquée, qui n'est pas idéale pour la régression linéaire, rendant les résultats difficilement interprétables.

Il aurait été intéressant d'introduire plus de facteurs du questionnaire dans l'analyse finale tels que la présence d'autres animaux sur le site, l'administration ou non de compléments en oligo-éléments en vache en fin de gestation... L'analyse des facteurs a été limitée par l'étude

préexistante. L'étude du facteur co-infection aurait également pu être réalisée en utilisant une autre partie des résultats de HealthyCalf (identification d'autres pathogènes détectés par le test SpeedVdiar sur le terrain ou par PCR en laboratoire).

Il aurait pu également être intéressant de prélever les veaux en fèces à J0, J3 et J7 (J0 correspondant au premier prélèvement et J3 et J7 à 3 et 7 jours respectivement après celui-ci) au lieu d'une seule fois afin d'évaluer l'évolution de la présence de pathogènes dans les fèces des veaux (permettrait d'avoir une image plus « dynamique » que le protocole actuel).

Une autre approche, qui aurait aussi pu être réalisée, aurait été d'analyser les aspects zoonotiques en réalisant des prélèvements couplés sur les étudiantes effectuant les prélèvements, un avant le début de campagne et un en fin de campagne pour recherche de *cryptosporidium* ou recherche de l'infection. De même les éleveurs et leur entourage auraient aussi pu participer en se faisant prélever pour étudier une probable contamination de l'entourage proche des élevages. Toutefois ce type de prélèvement sur humain nécessite des autorisations préalables et l'aspect zoonotique de *Cryptosporidium* n'était pas un objectif du projet Healthy Calf.

Conclusion

Cryptosporidium est ainsi fréquemment retrouvé chez les veaux nouveau-nés en élevage Breton et plus particulièrement chez ceux atteints de diarrhée. La prévalence moyenne de ce parasite dans notre étude était de 15%. Et le génotype le plus communément identifié était *C. parvum* sous type IIaA15G2R1 (identifié dans 53% des prélèvements). Il est important de noter que dans les *cryptosporidium* identifiés seul *C. andersoni* et *C. bovis* ne sont pas zoonotiques. La prophylaxie sanitaire apparaît donc cruciale pour lutter contre ce parasite au sein des élevages et pour limiter les contaminations zoonotiques par la suite. En effet sa résistance importante dans l'environnement et le peu de traitements efficaces le rende difficile à éradiquer une fois installé dans un élevage.

Le mode d'administration du colostrum par tétée ou sondage apparaît comme un facteur protecteur contre ce parasite. Ces modalités d'administration seraient à privilégier par rapport à l'administration au biberon.

Bibliographie

ABEYWARDENA, Harshanie, JEX, Aaron R. et GASSER, Robin B., 2015. A Perspective on *Cryptosporidium* and Giardia, with an Emphasis on Bovines and Recent Epidemiological Findings. In : *Advances in Parasitology* [en ligne]. Elsevier. pp. 243-301. ISBN 978-0-12-802268-9. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X1500010X>

AHMED, Shahira A. et KARANIS, Panagiotis, 2018. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. *Parasitology Research*. mars 2018. Vol. 117, n° 3, pp. 629-653. DOI 10.1007/s00436-017-5735-0.

AL MAWLY, J., GRINBERG, A., PRATTLE, D., MOFFAT, J., MARSHALL, J. et FRENCH, N., 2015. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *The Veterinary Journal* [en ligne]. 1 février 2015. Vol. 203, n° 2, pp. 155-160. DOI 10.1016/j.tvjl.2015.01.010. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023315000283>

ALSMARK, Cecilia, NOLSKOG, Peter, ANGERVALL, Anna Lindqvist, TOEPFER, Michael, WINIECKA-KRUSNELL, Jadwiga, BOUWMEESTER, Johanna, BJELKMAR, Pär, TROELL, Karin, LAHTI, Elina et BESER, Jessica, 2018. Two outbreaks of cryptosporidiosis associated with cattle spring pasture events. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* [en ligne]. 1 décembre 2018. Vol. 14, pp. 71-74. DOI 10.1016/j.vprsr.2018.09.003. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240593901830042X>

ALZIEU, Jean-Pierre, DORCHIES, Philippe, DUNCAN, James et LOSSON, Bertrand, 2012. *Parasitologie clinique des bovins*. Med'com. Vade-mecum. ISBN 978-2-35403-079-7.

ARSENOPOULOS, K., THEODORIDIS, A. et PAPADOPOULOS, E., 2017. Effect of colostrum quantity and quality on neonatal calf diarrhoea due to *Cryptosporidium* spp. infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* [en ligne]. 1 août 2017. Vol. 53, pp. 50-55. DOI 10.1016/j.cimid.2017.07.005. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957117300607>

ASKARI, N., SHAYAN, P., MOKHBER-DEZFOULI, M. R., EBRAHIMZADEH, E., LOTFOLLAHZADEH, S., ROSTAMI, A., AMININIA, N. et RAGH, M. J., 2016. Evaluation of recombinant P23 protein as a vaccine for passive immunization of newborn calves against *Cryptosporidium parvum*. *Parasite Immunology* [en ligne]. 2016. Vol. 38, n° 5, pp. 282-289. DOI <https://doi.org/10.1111/pim.12317>. Disponible à l'adresse : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pim.12317>

AUBRY, Pierre et GAÜZÈRE, Bernard-Alex, 2018. Tests de diagnostic rapide par immunochromatographie en zones tropicales. [en ligne]. 2018. pp. 10. Disponible à l'adresse : <http://medecinetroppicale.free.fr/cours/testrapide.pdf>

BARTA, John R. et THOMPSON, R. C. Andrew, 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology* [en ligne]. 1 octobre 2006. Vol. 22, n° 10, pp. 463-468. DOI 10.1016/j.pt.2006.08.001. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492206002029>

BAZELEY, Katrine, 2003. Investigation of diarrhoea in the neonatal calf. *In Practice* [en ligne]. 2003. Vol. 25, n° 3, pp. 152-159. DOI 10.1136/inpract.25.3.152. Disponible à l'adresse : <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/inpract.25.3.152>

BENSCHOP, Jackie, BOOKER, Christina M., SHADBOLT, Tui et WESTON, Jenny F., 2017. A Retrospective Cohort Study of an Outbreak of Cryptosporidiosis among Veterinary Students. *Veterinary Sciences* [en ligne]. 24 mai 2017. Vol. 4, n° 2. DOI 10.3390/vetsci4020029. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5606607/>

BJÖRKMAN, C., LINDSTRÖM, L., OWESON, C., AHOLA, H., TROELL, K. et AXÉN, C., 2015. *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology* [en ligne]. juillet 2015. Vol. 142, n° 8, pp. 1108-1114. DOI 10.1017/S0031182015000426. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4453919/>

BOROWSKI, H., THOMPSON, R. C. A., ARMSTRONG, T. et CLODE, P. L., 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology*. janvier 2010. Vol. 137, n° 1, pp. 13-26. DOI 10.1017/S0031182009990837.

BRADFORD P. SMITH et PUSTERLA, Nicola, 2019. *Large Animal Internal Medicine*. 6ème édition. Mosby-Saunders. ISBN 978-0-323-67688-5.

BRAINARD, Julii, HOOPER, Lee, MCFARLANE, Savannah, HAMMER, Charlotte C., HUNTER, Paul R. et TYLER, Kevin, 2020. Systematic review of modifiable risk factors shows little evidential support for most current practices in *Cryptosporidium* management in bovine calves. *Parasitology Research*. novembre 2020. Vol. 119, n° 11, pp. 3571-3584. DOI 10.1007/s00436-020-06890-2.

BROOK, Emily, HART, C. Anthony, FRENCH, Nigel et CHRISTLEY, Robert, 2008. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in young calves. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 25 mars 2008. Vol. 152, n° 1, pp. 46-52. DOI 10.1016/j.vetpar.2007.12.003. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401707006565>

BURTON, A. J., NYDAM, D. V., JONES, G., ZAMBRISKI, J. A., LINDEN, T. C., COX, G., DAVIS, R., BROWN, A. et BOWMAN, D. D., 2011. Antibody responses following administration of a *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 10 janvier 2011. Vol. 175, n° 1, pp. 178-181. DOI 10.1016/j.vetpar.2010.09.013. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171000511X>

CASTRO-HERMIDA, José Antonio, ALMEIDA, André, GONZÁLEZ-WARLETA, Marta, CORREIA DA COSTA, José M., RUMBO-LORENZO, Carlos et MEZO, Mercedes, 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research* [en ligne]. 1 octobre 2007. Vol. 101, n° 5, pp. 1443-1448. DOI 10.1007/s00436-007-0624-6. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0624-6>

CAVALIER-SMITH, Thomas, 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology* [en ligne]. 1 octobre 2014. Vol. 50, n° 5, pp. 472-495.

DOI 10.1016/j.ejop.2014.07.002. Disponible à l'adresse :
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0932473914000534>

CHALMERS, Rachel M., PÉREZ-CORDÓN, Gregorio, CACCIÓ, Simone M., KLOTZ, Christian et ROBERTSON, Lucy J., 2018. *Cryptosporidium* genotyping in Europe: The current status and processes for a harmonised multi-locus genotyping scheme. *Experimental Parasitology* [en ligne]. 1 août 2018. Vol. 191, pp. 25-30. DOI 10.1016/j.exppara.2018.06.004. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489418300936>

CHAPUY, Hélène, 2019. *Génotypage des souches de Cryptosporidium identifiées chez les veaux nouveau-nés et leurs mères en Bretagne* [en ligne]. other. Disponible à l'adresse : <https://oatao.univ-toulouse.fr/25831>

CHECKLEY, William, WHITE, A Clinton, JAGANATH, Devan, ARROWOOD, Michael J, CHALMERS, Rachel M, CHEN, Xian-Ming, FAYER, Ronald, GRIFFITHS, Jeffrey K, GUERRANT, Richard L, HEDSTROM, Lizbeth, HUSTON, Christopher D, KOTLOFF, Karen L, KANG, Gagandeep, MEAD, Jan R, MILLER, Mark, PETRI, William A, PRIEST, Jeffrey W, ROOS, David S, STRIEPEN, Boris, THOMPSON, R C Andrew, WARD, Honorine D, VAN VOORHIS, Wesley A, XIAO, Lihua, ZHU, Guan et HOUPPT, Eric R, 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases* [en ligne]. 1 janvier 2015. Vol. 15, n° 1, pp. 85-94. DOI 10.1016/S1473-3099(14)70772-8. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309914707728>

CHO, Yong-Il, HAN, Jae-Ik, WANG, Chong, COOPER, Vickie, SCHWARTZ, Kent, ENGELKEN, Terry et YOON, Kyoung-Jin, 2013. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary Microbiology*. 25 octobre 2013. Vol. 166, n° 3-4, pp. 375-385. DOI 10.1016/j.vetmic.2013.07.001.

CHO, Yong-Il et YOON, Kyoung-Jin, 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science*. 2014. Vol. 15, n° 1, pp. 1-17. DOI 10.4142/jvs.2014.15.1.1.

COMITÉS DE DÉVELOPPEMENT DU FINISTÈRE, 2014. La maîtrise des diarrhées chez les veaux laitiers. *Le point sur ...* [en ligne]. 2014. Disponible à l'adresse : [http://www.bretagne.synagri.com/ca1/PJ.nsf/TECHPJPARCLEF/22398/\\$File/PS_diarrh%C3%A9es%20veaux_2014.pdf?OpenElement](http://www.bretagne.synagri.com/ca1/PJ.nsf/TECHPJPARCLEF/22398/$File/PS_diarrh%C3%A9es%20veaux_2014.pdf?OpenElement)

DANIŠOVÁ, Olga, HALÁNOVÁ, Monika, VALENČÁKOVÁ, Alexandra et LUPTÁKOVÁ, Lenka, 2018. Sensitivity, specificity and comparison of three commercially available immunological tests in the diagnosis of *Cryptosporidium* species in animals. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. mars 2018. Vol. 49, n° 1, pp. 177-183. DOI 10.1016/j.bjm.2017.03.016.

DE LA FUENTE, R, LUZÓN, M, RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A, GARCÍA, A, CID, D, ORDEN, J. A, GARCÍA, S, SANZ, R et GÓMEZ-BAUTISTA, M, 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 14 janvier 1999. Vol. 80, n° 3, pp. 179-185. DOI 10.1016/S0304-4017(98)00218-0. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401798002180>

DELAFOSSÉ, A., CHARTIER, C., DUPUY, M. C., DUMOULIN, M., PORS, I. et PARAUD, C., 2015. *Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in western France. *Preventive Veterinary Medicine*. 1 mars 2015. Vol. 118, n° 4, pp. 406-412. DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.01.005.

DÍAZ, P., VARCASIA, A., PIPIA, A. P., TAMPONI, C., SANNA, G., PRIETO, A., RUIU, A., SPISSU, P., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. et SCALA, A., 2018. Molecular characterisation and risk factor analysis of *Cryptosporidium* spp. in calves from Italy. *Parasitology Research* [en ligne]. octobre 2018. Vol. 117, n° 10, pp. 3081-3090. DOI 10.1007/s00436-018-6000-x. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/s00436-018-6000-x>

DOAN, Yen Hai, NAKAGOMI, Toyoko, ABOUDY, Yair, SILBERSTEIN, Ilana, BEHAR-NOVAT, Esther, NAKAGOMI, Osamu et SHULMAN, Lester M., 2013. Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *Journal of Clinical Microbiology*. janvier 2013. Vol. 51, n° 1, pp. 182-189. DOI 10.1128/JCM.02062-12.

EVANS, Caitlin A., PINIOR, Beate, LARSKA, Magdalena, GRAHAM, David, SCHWEIZER, Matthias, GUIDARINI, Christian, DECARO, Nicola, RIDPATH, Julia et GATES, M. Carolyn, 2019. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transboundary and Emerging Diseases*. mars 2019. Vol. 66, n° 2, pp. 640-652. DOI 10.1111/tbed.13068.

FAYER, Ronald et XIAO, Lihua, 2008. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. 2eme édition. IWA publishing. ISBN 978-1-4200-5226-8.

FENG, Yaoyu, RYAN, Una M. et XIAO, Lihua, 2018. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*. novembre 2018. Vol. 34, n° 11, pp. 997-1011. DOI 10.1016/j.pt.2018.07.009.

FOLLET, Jérôme, GUYOT, Karine, LERUSTE, Hélène, FOLLET-DUMOULIN, Anne, HAMMOUMA-GHELBOUN, Ourida, CERTAD, Gabriela, DEI-CAS, Eduardo et HALAMA, Patrice, 2011. *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Veterinary Research*. 2 décembre 2011. Vol. 42, pp. 116. DOI 10.1186/1297-9716-42-116.

FRANCOZ, David, NICHOLS, Sylvain et SCHELCHER, François, 2017. Les diarrhées du veau nouveau né. In : *Guide pratique des maladies du veau*. Med'com. pp. 186 à 210. Guide pratique. ISBN 978-2-35403-243-2.

GHARIEB, Rasha M. A., BOWMAN, Dwight D., LIOTTA, Janice L. et XIAO, Lihua, 2019. Isolation, genotyping and subtyping of single *Cryptosporidium* oocysts from calves with special reference to zoonotic significance. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 1 juillet 2019. Vol. 271, pp. 80-86. DOI 10.1016/j.vetpar.2019.05.003. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401719300974>

GHAZY, Alaa A., SHAFY, Sobhy Abdel- et SHAAPAN, Rafaat M., 2015. Cryptosporidiosis in Animals and Man: 1. Taxonomic Classification, Life Cycle, Epidemiology and Zoonotic Importance. *Asian Journal of Epidemiology* [en ligne]. 15 juin 2015. Vol. 8, n° 3, pp. 48-63.

DOI 10.3923/aje.2015.48.63. Disponible à l'adresse :
<https://www.scialert.net/abstract/?doi=aje.2015.48.63>

GOMEZ, Diego E. et WEESE, J. Scott, 2017. Viral enteritis in calves. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. décembre 2017. Vol. 58, n° 12, pp. 1267-1274.

Guide pratique des maladies des bovins - Editions France Agricole, 2011. [en ligne]. Disponible à l'adresse :
https://www.editions-france-agricole.fr/site/gfaed/BOVIN__gfaed.4464.19753__fr/boutique/produit.html

GULLIKSEN, S. M., JOR, E., LIE, K. I., HAMNES, I. S., LØKEN, T., ÅKERSTEDT, J. et ØSTERÅS, O., 2009. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science* [en ligne]. 1 octobre 2009. Vol. 92, n° 10, pp. 5057-5066. DOI 10.3168/jds.2009-2080. Disponible à l'adresse :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030209708380>

HATAM-NAHAVANDI, Kareem, AHMADPOUR, Ehsan, CARMENA, David, SPOTIN, Adel, BANGOURA, Berit et XIAO, Lihua, 2019. *Cryptosporidium* infections in terrestrial ungulates with focus on livestock: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*. 14 septembre 2019. Vol. 12, n° 1, pp. 453. DOI 10.1186/s13071-019-3704-4.

HOLZHAUSEN, I., LENDNER, M., GÖHRING, F., STEINHÖFEL, I. et DAUGSCHIES, A., 2019. Distribution of *Cryptosporidium* parvum gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany. *Parasitology Research* [en ligne]. 1 mai 2019. Vol. 118, n° 5, pp. 1549-1558. DOI 10.1007/s00436-019-06266-1. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06266-1>

HOXIE, N. J., DAVIS, J. P., VERGERONT, J. M., NASHOLD, R. D. et BLAIR, K. A., 1997. Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *American Journal of Public Health*. décembre 1997. Vol. 87, n° 12, pp. 2032-2035. DOI 10.2105/ajph.87.12.2032.

IMRE, M., ILIE, M., IMRE, K. et DĂRĂBUȘ, G., 2015. Risk factors associated with *Cryptosporidium* infection in diarrheic pre-weaned calves. *XVII International Congress on Animal Hygiene* [en ligne]. 2015. pp. p.184. Disponible à l'adresse : https://www.isah-soc.org/userfiles/downloads/proceedings/2015_Proceedings.pdf

INNES, Elisabeth A., CHALMERS, Rachel M., WELLS, Beth et PAWLOWIC, Mattie C., 2020. A One Health Approach to Tackle Cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*. mars 2020. Vol. 36, n° 3, pp. 290-303. DOI 10.1016/j.pt.2019.12.016.

INSTITUT DE L'ÉLEVAGE, 2008. *Maladies des Bovins*. 4ème édition. France agricole EDS. ISBN 2-85557-149-9.

JARVIE, B. D., TROTZ-WILLIAMS, L. A., MCKNIGHT, D. R., LESLIE, K. E., WALLACE, M. M., TODD, C. G., SHARPE, P. H. et PEREGRINE, A. S., 2005. Effect of Halofuginone Lactate on the Occurrence of *Cryptosporidium* parvum and Growth of Neonatal Dairy Calves. *Journal of Dairy Science* [en ligne]. 1 mai 2005. Vol. 88, n° 5, pp. 1801-1806. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(05)72854-X. Disponible à l'adresse :
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020572854X>

JEGOU, V, PORHIEL, J Y, BRUNSCHWIG, P et JOUANNE, D, 2006. Mortalité des veaux d'élevage en Bretagne : Facteurs de risque de mortalité dans 80 élevages bretons. . 2006. pp. 4.

JEX, A. R., SMITH, H. V., MONIS, P. T., CAMPBELL, B. E. et GASSER, R. B., 2008. *Cryptosporidium* — Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances* [en ligne]. 1 juillet 2008. Vol. 26, n° 4, pp. 304-317. DOI 10.1016/j.biotechadv.2008.02.003. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008000189>

JEX, Aaron R. et GASSER, Robin B., 2009. Diagnostic and analytical mutation scanning of *Cryptosporidium*: utility and advantages. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. mars 2009. Vol. 9, n° 2, pp. 179-185. DOI 10.1586/14737159.9.2.179.

KHAN, Asis, SHAIK, Jahangheer S. et GRIGG, Michael E., 2018. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica* [en ligne]. 1 août 2018. Vol. 184, pp. 1-14. DOI 10.1016/j.actatropica.2017.10.023. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17308896>

KING, B. J. et MONIS, P. T., 2007. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology*. mars 2007. Vol. 134, n° Pt 3, pp. 309-323. DOI 10.1017/S0031182006001491.

KOH, Wan, THOMPSON, Andrew, EDWARDS, Hanna, MONIS, Paul et CLODE, Peta L., 2014. Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BMC microbiology*. 18 novembre 2014. Vol. 14, pp. 281. DOI 10.1186/s12866-014-0281-8.

LACROUTE, Hélène, 2016. Place de la colibacillose chez le jeune veau et antibiorésistance dans l'Allier (2011-2013). *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* [en ligne]. 2016. Vol. 169, n° 2, pp. 100-109. DOI 10.4267/2042/60850. Disponible à l'adresse : https://www.persee.fr/doc/bavf_0001-4192_2016_num_169_2_1639

LEETZ, Anna Susanne, SOTIRIADOU, Isaia, ONGERTH, Jerry et KARANIS, Panagiotis, 2007. An evaluation of primers amplifying DNA targets for the detection of *Cryptosporidium* spp. using *C. parvum* HNJ-1 Japanese isolate in water samples. *Parasitology Research* [en ligne]. 1 septembre 2007. Vol. 101, n° 4, pp. 951-962. DOI 10.1007/s00436-007-0567-y. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0567-y>

LEFAY, D., NACIRI, M., POIRIER, P. et CHERMETTE, R., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Veterinary Parasitology*. 28 mars 2000. Vol. 89, n° 1-2, pp. 1-9. DOI 10.1016/s0304-4017(99)00230-7.

LIU, Hua, SHEN, Yujian, YIN, Jianhai, YUAN, Zhongying, JIANG, Yanyan, XU, Yuxin, PAN, Wei, HU, Yuan et CAO, Jianping, 2014. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, Enterocytozoon, Giardia and Cyclospora in diarrheal outpatients in China. *BMC infectious diseases*. 13 janvier 2014. Vol. 14, pp. 25. DOI 10.1186/1471-2334-14-25.

LOU, Lixin, ZHANG, Peng, PIAO, Rongli et WANG, Yang, 2019. Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [en ligne]. 2019. Vol. 9, pp. 270. DOI 10.3389/fcimb.2019.00270. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2019.00270>

MADDOX-HYTTEL, Charlotte, LANGKJÆR, Rikke B., ENEMARK, Heidi L. et VIGRE, Håkan, 2006. *Cryptosporidium* and Giardia in different age groups of Danish cattle and pigs— Occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 10 octobre 2006. Vol. 141, n° 1, pp. 48-59. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.04.032. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03044401706002780>

MAMMERI, Mohamed, CHEVILLOT, Aurélie, CHENAFI, Ilham, THOMAS, Myriam, JULIEN, Christine, VALLÉE, Isabelle, POLACK, Bruno, FOLLET, Jérôme et ADJOU, Karim Tarik, 2019. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from diarrheal dairy calves in France. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* [en ligne]. 1 décembre 2019. Vol. 18, pp. 100323. DOI 10.1016/j.vprsr.2019.100323. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405939019300681>

MATOOCK, MY, EL-BABLY, MA et EL-BAHY, MM, 2005. Management practices for minimizing environmental risk factors associated with *Cryptosporidium* in dairy calves. *Veterinary Medical Journal Giza*. 2005.

MOHLER, Virginia L., IZZO, Matthew M. et HOUSE, John K., 2009. Salmonella in calves. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. mars 2009. Vol. 25, n° 1, pp. 37-54, vi. DOI 10.1016/j.cvfa.2008.10.009.

NIINE, Tarmo, DORBEEK-KOLIN, Elisabeth, LASSEN, Brian et ORRO, Toomas, 2018. *Cryptosporidium* outbreak in calves on a large dairy farm: Effect of treatment and the association with the inflammatory response and short-term weight gain. *Research in Veterinary Science*. avril 2018. Vol. 117, pp. 200-208. DOI 10.1016/j.rvsc.2017.12.015.

OLSON, M. E., RALSTON, B. J., O'HANDLEY, R., GUSELLE, N. J. et APPELBEE, A. J., 2003. Chapter 4 - What is the Clinical and Zoonotic Significance of Cryptosporidiosis in Domestic Animals and Wildlife. In : THOMPSON, RC Andrew, ARMSON, Anthony et RYAN, Una M. (éd.), *Cryptosporidium* [en ligne]. Amsterdam : Elsevier. pp. 51-68. ISBN 978-0-444-51351-9. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444513519500070>

OTTO, Peter H., CLARKE, Ian N., LAMBDEN, Paul R., SALIM, Omar, REETZ, Jochen et LIEBLER-TENORIO, Elisabeth M., 2011. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. *Journal of Virology*. novembre 2011. Vol. 85, n° 22, pp. 12013-12021. DOI 10.1128/JVI.05342-11.

OUAKLI, Nadia, BELKHIRI, Aouatif, DE LUCIO, Aida, KÖSTER, Pamela C., DJOUDI, Mustapha, DADDA, Aness, KHELEF, Djamel, KAIDI, Rachid et CARMENA, David, 2018. *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*. mai 2018. Vol. 12, pp. 78-84. DOI 10.1016/j.vprsr.2018.02.005.

RAVARY, Béangère, SATTLER, Nicolas et ROCH, Nicolas, 2006. *Néonatalogie du veau*. Du point vétérinaire. ISBN 978-2-86326-226-9.

RIDPATH, Julia F., FULTON, Robert W., KIRKLAND, Peter D. et NEILL, John D., 2010. Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American*

Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. mars 2010. Vol. 22, n° 2, pp. 184-191. DOI 10.1177/104063871002200203.

RIEUX, Anaïs, 2013. Cryptosporidiose chez les ruminants domestiques en France : épidémiologie moléculaire et potentiel zoonotique. . 2013. pp. 299.

RIEUX, Anaïs, PARAUD, Carine, PORS, Isabelle et CHARTIER, Christophe, 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 18 octobre 2013. Vol. 197, n° 1, pp. 7-12. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.05.001. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171300280X>

RIEUX, Anaïs, PARAUD, Carine, PORS, Isabelle et CHARTIER, Christophe, 2014. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 28 mai 2014. Vol. 202, n° 3, pp. 171-179. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.03.004. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714001514>

RYAN, Una, FAYER, Ronald et XIAO, Lihua, 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. novembre 2014. Vol. 141, n° 13, pp. 1667-1685. DOI 10.1017/S0031182014001085.

RYAN, Una et XIAO, Lihua, 2014. Taxonomy and Molecular Taxonomy. In : CACCIÒ, Simone M. et WIDMER, Giovanni (éd.), *Cryptosporidium: parasite and disease* [en ligne]. Vienna : Springer. pp. 3-41. ISBN 978-3-7091-1562-6. Disponible à l'adresse : https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1562-6_1

SANTÉ CANADA, 2019. *Les protozoaires entériques : Giardia et Cryptosporidium* [en ligne]. 2019. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Disponible à l'adresse : https://epe.lac-bac.gc.ca/100/201/301/weekly_acquisitions_list-ef/2019/19-16/publications.gc.ca/collections/collection_2019/sc-hc/H144-13-10-2018-fra.pdf Document technique

SANTÍN, Mónica, TROUT, James M. et FAYER, Ronald, 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 1 août 2008. Vol. 155, n° 1, pp. 15-23. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.04.018. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708002446>

SANTORO, Azzurra, DORBEK-KOLIN, Elisabeth, JEREMEJEVA, Julia, TUMMELEHT, Lea, ORRO, Toomas, JOKELAINEN, Pikka et LASSEN, Brian, 2019. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in calves in Estonia: high prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding and 10 subtypes identified. *Parasitology* [en ligne]. février 2019. Vol. 146, n° 2, pp. 261-267. DOI 10.1017/S0031182018001348. Disponible à l'adresse : <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/molecular-epidemiology-of-cryptosporidium-spp-in-calves-in-estonia-high-prevalence-of-cryptosporidium-parvum-shedding-and-10-subtypes-identified/B29F22F1BA93225AFFA343573D6FAB41>

SCHUMANN, F J, TOWNSEND, H G et NAYLOR, J M, 1990. Risk factors for mortality from diarrhea in beef calves in Alberta. *Canadian Journal of Veterinary Research* [en ligne]. juin 1990. Vol. 54, n° 3, pp. 366-372. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255671/>

SHAHIDUZZAMAN, Md. et DAUGSCHIES, Arwid, 2012. Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 10 septembre 2012. Vol. 188, n° 3, pp. 203-214. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.03.052. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401712001768>

SILVA ABREU, Bueno, PIRES, Luanna, SANTOS, Karina, OLIVEIRA, Marcelo et JÚNIOR, Severino, 2019. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and its association with ponderal development and diarrhea episodes in nellore mixed breed cattle. *Acta Veterinaria Brasilica*. 28 mars 2019. Vol. 13, pp. 24-29. DOI 10.21708/avb.2019.13.1.7977.

SILVERLÅS, Charlotte, EMANUELSON, Ulf, DE VERDIER, Kerstin et BJÖRKMAN, Camilla, 2009. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* [en ligne]. 1 août 2009. Vol. 90, n° 3, pp. 242-253. DOI 10.1016/j.prevetmed.2009.04.006. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587709000889>

SMITH, David R., 2012. Field Disease Diagnostic Investigation of Neonatal Calf Diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* [en ligne]. 1 novembre 2012. Vol. 28, n° 3, pp. 465-481. DOI 10.1016/j.cvfa.2012.07.010. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072012000618>

STARKEY, Simon R., WADE, Susan E., SCHAAF, Stephanie et MOHAMMED, Hussni O., 2005. Incidence of *Cryptosporidium parvum* in the dairy cattle population in a New York City Watershed. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 10 août 2005. Vol. 131, n° 3, pp. 197-205. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.04.040. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705002001>

SZONYI, Barbara, CHANG, Yung-Fu, WADE, Susan E. et MOHAMMED, Hussni O., 2012. Evaluation of factors associated with the risk of infection with *Cryptosporidium parvum* in dairy calves. *American Journal of Veterinary Research* [en ligne]. 1 janvier 2012. Vol. 73, n° 1, pp. 76-85. DOI 10.2460/ajvr.73.1.76. Disponible à l'adresse : <https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.73.1.76>

TAREKEGN, Zewdu Seyoum, TIGABU, Yeshifana et DEJENE, Haileyesus, 2021. *Cryptosporidium* infection in cattle and humans in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Parasite Epidemiology and Control* [en ligne]. 1 août 2021. Vol. 14, pp. e00219. DOI 10.1016/j.parepi.2021.e00219. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405673121000209>

TAYLAN-OZKAN, Aysegul, YASA-DURU, Sibel, USLUCA, Selma, LYSÉN, Colleen, YE, Jianbin, ROELLIG, Dawn M., FENG, Yaoyu et XIAO, Lihua, 2016. *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in dairy calves and goat kids reared under traditional farming systems in Turkey. *Experimental Parasitology* [en ligne]. 1 novembre 2016. Vol. 170, pp. 16-20. DOI 10.1016/j.exppara.2016.06.014. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489416301369>

TEWARI, Anita, 2012. Neonatal Calf Diarrhoea. *Indian Dairyman* [en ligne]. 2012. Vol. 64, n° 11, pp. 54-57. Disponible à l'adresse : <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123406657>

THOMPSON, R.C. Andrew, KOH, Wan H. et CLODE, Peta L., 2016. *Cryptosporidium* — What is it? *Food and Waterborne Parasitology* [en ligne]. septembre 2016. Vol. 4, pp. 54-61. DOI 10.1016/j.fawpar.2016.08.004. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405676616300142>

THOMPSON, R.C.A., ARMSON, A. et RYAN, U.M., 2003. *Cryptosporidium: From Molecules to Disease*. Elsevier. ISBN 978-0-444-51351-9.

THOMSON, Sarah, HAMILTON, Carly A., HOPE, Jayne C., KATZER, Frank, MABBOTT, Neil A., MORRISON, Liam J. et INNES, Elisabeth A., 2017. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*. 11 août 2017. Vol. 48, n° 1, pp. 42. DOI 10.1186/s13567-017-0447-0.

THOMSON, Sarah, INNES, Elisabeth A., JONSSON, Nicholas N. et KATZER, Frank, 2019. Shedding of *Cryptosporidium* in calves and dams: evidence of re-infection and shedding of different gp60 subtypes. *Parasitology*. septembre 2019. Vol. 146, n° 11, pp. 1404-1413. DOI 10.1017/S0031182019000829.

TOMAZIC, M. L., RODRIGUEZ, A. E., LOMBARDELLI, J., POKLEPOVICH, T., GARRO, C., GALARZA, R., TIRANTI, K., FLORIN-CHRISTENSEN, M. et SCHNITTGER, L., 2018. Identification of novel vaccine candidates against cryptosporidiosis of neonatal bovines by reverse vaccinology. *Veterinary Parasitology* [en ligne]. 15 décembre 2018. Vol. 264, pp. 74-78. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.11.007. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401718303741>

TROTZ-WILLIAMS, L. A., JARVIE, B. D., PEREGRINE, A. S., DUFFIELD, T. F. et LESLIE, K. E., 2011. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *The Veterinary Record*. 14 mai 2011. Vol. 168, n° 19, pp. 509. DOI 10.1136/vr.d1492.

TROTZ-WILLIAMS, Lise A., MARTIN, S. Wayne, LESLIE, Kenneth E., DUFFIELD, Todd, NYDAM, Daryl V. et PEREGRINE, Andrew S., 2008. Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Preventive Veterinary Medicine* [en ligne]. 1 janvier 2008. Vol. 83, n° 1, pp. 11-23. DOI 10.1016/j.prevetmed.2007.03.001. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587707000657>

TROTZ-WILLIAMS, Lise A., WAYNE MARTIN, S., LESLIE, Kenneth E., DUFFIELD, Todd, NYDAM, Daryl V. et PEREGRINE, Andrew S., 2007. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine* [en ligne]. 15 novembre 2007. Vol. 82, n° 1, pp. 12-28. DOI 10.1016/j.prevetmed.2007.05.003. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587707001079>

TROU, Guylaine, LE GUÉNIC, Marylise, MAURIN, Loïc, LECLERC, Hélène, MOUNAIX, Béatrice et JEGAT, Paul, 2016. Mortalité des veaux pas de fatalités mais des solutions. *Terra* [en ligne]. 2016. Disponible à l'adresse : [http://www.bretagne.synagri.com/ca1/PJ.nsf/TECHPJPARCLEF/28138/\\$File/559_Nov_mortalite%20des%20veaux%20par%20de%20fatalite%20mais%20des%20solutions_P17.PDF?OpenElement](http://www.bretagne.synagri.com/ca1/PJ.nsf/TECHPJPARCLEF/28138/$File/559_Nov_mortalite%20des%20veaux%20par%20de%20fatalite%20mais%20des%20solutions_P17.PDF?OpenElement)

URIE, N. J., LOMBARD, J. E., SHIVLEY, C. B., ADAMS, A. E., KOPRAL, C. A. et SANTIN, M., 2018. Prewaned heifer management on US dairy operations: Part III. Factors associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* in preweaned dairy heifer calves. *Journal of Dairy Science*. octobre 2018. Vol. 101, n° 10, pp. 9199-9213. DOI 10.3168/jds.2017-14060.

VALIGUROVÁ, Andrea, JIRKŮ, Miloslav, KOUDELA, Břetislav, GELNAR, Milan, MODRÝ, David et ŠLAPETA, Jan, 2008. Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for Parasitology* [en ligne]. 1 juillet 2008. Vol. 38, n° 8, pp. 913-922. DOI 10.1016/j.ijpara.2007.11.003. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907003955>

VANDAĚLE, Eric, 2019. La paromomycine approuvée contre la crypto des veaux au Royaume-Uni et en Espagne... mais pas en France. *Le fil vet* [en ligne]. 2019. Disponible à l'adresse : <https://www.lefil.vet/?art=1189&init=1>

VÉLEZ, Juan, LANGE, Malin K., ZIEGER, Peter, YOON, Ilkyu, FAILING, Klaus et BAUER, Christian, 2019. Long-term use of yeast fermentation products in comparison to halofuginone for the control of cryptosporidiosis in neonatal calves. *Veterinary Parasitology*. mai 2019. Vol. 269, pp. 57-64. DOI 10.1016/j.vetpar.2019.04.008.

WEBER, S E, LIPPUNER, C, CORTI, S, DEPLAZES, P et HÄSSIG, M, 2016. Clinical epidemiology of cryptosporidiosis in calves. *Schweiz Arch Tierheilkd* [en ligne]. 5 mai 2016. Vol. 158, n° 5, pp. 341-350. DOI 10.17236/sat00062. Disponible à l'adresse : <http://sat.gstsvs.ch/de/pubmed/?doi=10.17236/sat00062>

WYATT, Carol R., RIGGS, Michael W. et FAYER, Ronald, 2010. Cryptosporidiosis in Neonatal Calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* [en ligne]. 1 mars 2010. Vol. 26, n° 1, pp. 89-103. DOI 10.1016/j.cvfa.2009.10.001. Disponible à l'adresse : [https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(09\)00099-1/fulltext](https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(09)00099-1/fulltext)

XIAO, Lihua, 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology* [en ligne]. 1 janvier 2010. Vol. 124, n° 1, pp. 80-89. DOI 10.1016/j.exppara.2009.03.018. Disponible à l'adresse : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489409000927>

XIAO, Lihua et FENG, Yaoyu, 2017. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food and Waterborne Parasitology*. décembre 2017. Vol. 8-9, pp. 14-32. DOI 10.1016/j.fawpar.2017.09.002.

YEŞILBAĞ, Kadir, ALPAY, Gizem et BECHER, Paul, 2017. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Viruses*. 26 mai 2017. Vol. 9, n° 6. DOI 10.3390/v9060128.

Annexes

Annexe 1 : Tract personnalisé pour présenter le projet HealthyCalf aux éleveurs en 2018 (Chapuy 2019)

DES PROBLEMES DIGESTIFS ET/OU RESPIRATOIRES CHEZ VOS VEAUX ?



Healthy Calf recherche des élevages présentant des taux de mortalité et d'apparition de maladies élevés chez des veaux de moins de 2 mois de race Charolaise.

L'objectif final de ce programme de recherche est de sélectionner des animaux plus résistants aux principales infections digestives et respiratoires.

Si vous êtes dans cette situation entre novembre 2018 et janvier 2019 et/ou intéressés pour participer et recevoir plus d'informations, contactez-nous à :

healthy-calf@gds-bretagne.fr
en nous laissant vos coordonnées et numéro de cheptel

Nous vous remercions pour votre aide.

Cette étude est réalisée avec les partenaires suivants :



DES PROBLEMES DIGESTIFS ET/OU RESPIRATOIRES CHEZ VOS VEAUX ?



Healthy Calf recherche des élevages présentant des taux de mortalité et d'apparition de maladies élevés chez des veaux de moins de 2 mois de race Holstein.

L'objectif final de ce programme de recherche est de sélectionner des animaux plus résistants aux principales infections digestives et respiratoires.

Si vous êtes dans cette situation entre novembre 2018 et janvier 2019 et/ou intéressés pour participer et recevoir plus d'informations, contactez-nous à :

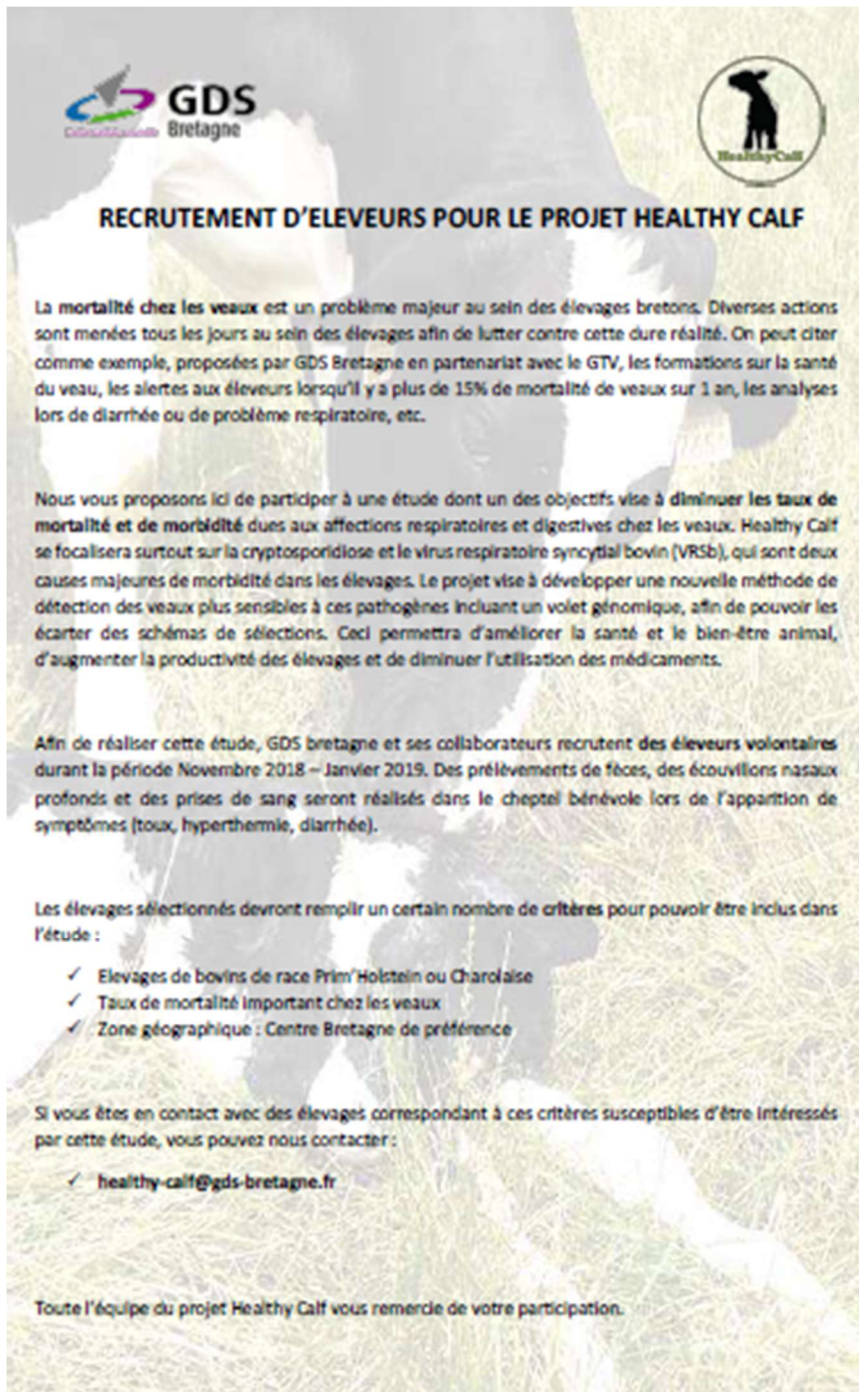
healthy-calf@gds-bretagne.fr
en nous laissant vos coordonnées et numéro de cheptel

Nous vous remercions pour votre aide.

Cette étude est réalisée avec les partenaires suivants :



Annexe 2 : Fiche détaillé du projet Healthy Calf pour les vétérinaires (Chapuy 2019)

The flyer features a background image of a cow in a field. In the top left corner is the GDS Bretagne logo, and in the top right is the Healthy Calf logo, which depicts a cow silhouette inside a circle. The main title is 'RECRUTEMENT D'ELEVEURS POUR LE PROJET HEALTHY CALF'. The text is organized into several paragraphs and a list of criteria.

RECRUTEMENT D'ELEVEURS POUR LE PROJET HEALTHY CALF

La mortalité chez les veaux est un problème majeur au sein des élevages bretons. Diverses actions sont menées tous les jours au sein des élevages afin de lutter contre cette dure réalité. On peut citer comme exemple, proposées par GDS Bretagne en partenariat avec le GTV, les formations sur la santé du veau, les alertes aux éleveurs lorsqu'il y a plus de 15% de mortalité de veaux sur 1 an, les analyses lors de diarrhée ou de problème respiratoire, etc.

Nous vous proposons ici de participer à une étude dont un des objectifs vise à diminuer les taux de mortalité et de morbidité dues aux affections respiratoires et digestives chez les veaux. Healthy Calf se focalisera surtout sur la cryptosporidiose et le virus respiratoire syncytial bovin (VRSb), qui sont deux causes majeures de morbidité dans les élevages. Le projet vise à développer une nouvelle méthode de détection des veaux plus sensibles à ces pathogènes incluant un volet génomique, afin de pouvoir les écarter des schémas de sélections. Ceci permettra d'améliorer la santé et le bien-être animal, d'augmenter la productivité des élevages et de diminuer l'utilisation des médicaments.

Afin de réaliser cette étude, GDS Bretagne et ses collaborateurs recrutent des éleveurs volontaires durant la période Novembre 2018 – Janvier 2019. Des prélèvements de fèces, des écouvillons nasaux profonds et des prises de sang seront réalisés dans le cheptel bénévole lors de l'apparition de symptômes (toux, hyperthermie, diarrhée).

Les élevages sélectionnés devront remplir un certain nombre de critères pour pouvoir être inclus dans l'étude :

- ✓ Elevages de bovins de race Prim'Holstein ou Charolaise
- ✓ Taux de mortalité important chez les veaux
- ✓ Zone géographique : Centre Bretagne de préférence

Si vous êtes en contact avec des élevages correspondant à ces critères susceptibles d'être intéressés par cette étude, vous pouvez nous contacter :

- ✓ healthy-calf@gds-bretagne.fr

Toute l'équipe du projet Healthy Calf vous remercie de votre participation.

Annexe 3 : Fiche de suivi clinique utilisé par les éleveurs pendant les deux premières campagnes

Fiche Health Card 2013-2013
Suivi des vaches malades (comportement fécal, fécal, affections respiratoires)

N° (de l'élevage)	Identification de vache malade	Sexe	État lactaire	Cycle précédent fécal	État précédent fécal	État actuel fécal	État actuel	État actuel
01								
02								
03								
04								
05								
06								
07								
08								
09								
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								
41								
42								
43								
44								
45								
46								
47								
48								
49								
50								
51								
52								
53								
54								
55								
56								
57								
58								
59								
60								

Appréciation	Comportement	Fécal	Affection fécale	État fécal	État fécal	État fécal	État fécal
1 Composé	1 Vif	1 Normal	1 Normal	1 Vif de 2 ^e	1 Normal		
2 Dorsal	2 Abais non débauché	2 Mable	rien	2 Fécal 2 ^e et 3 ^e	2 État fécal		
3 Tout dorsal (état fécal)	3 Ne se lever pas	3 Copiale	3 Abais	3 Fécal 3 ^e	3 État fécal		
4 ?	4 Dorsal	4 Tout fécal	4 ?	4 ?	4 ?		
	5 ?	5 Abais	5 ?				

Larmoiement	Intérag	Toux	Respiration	Émission
1 Oui	1 Non	1 Non	1 Normal	1 Émission
2 Non	2 Oui	2 Tout brachées soulevées	2 Accélérée	2 Stable
3 ?	3 Oui, déviant	3 Tout brachées soulevées peu fréquentes	3 Coup de foule	3 Préjudiciable
	4 Égal, partiel ou variable	4 Tout brachées soulevées fréquentes	4 ?	4 Mort
	5 ?	5 Tout brachées soulevées peu fréquentes		

Annexe 4 : Fiche excel de suivi clinique des veaux pour la campagne 2020-2021

N° EDE Elevage	Identification du veau	Sexe	Date Naissance	Âge veau	Date et heure prélèvement monovette l	Date Prélèvement Feces (âge veau)	Speed vitar	Date Prélèvement Ecouvillon (âge veau)	LBA	Date Sortie Elevage	Motif de sortie d'élevage			
	N° étiquette		12/07/2020	461										
Date du jou 16/10/2021														
Identification de la mère:														
Date	Temp éra-	Appétit	Compor tement	Feces	Réflexe succion	Pli de peau	Globe oculaire	Evoluti on/J-1	Larmoie ment	Jetage	Toux	Respirati on	Evolutio n/J-1	Traitement
J-1														
J0														
J1														
J2														
J3														
J4														
J5														
J6														
J7														

Appétit	Compor tement	Feces	Réflexe succion	Pli de peau	Globe oculaire	Larmoie ment	Jetage	Toux	Respirati on	Evolutio n/J-1
1 Conservé	1 Vif	1 Normales	1 Normal	1 Moins de 2"	1 Normal	1 Oui	1 Non	1 Non	1 Normale	1 Amélioration
2 Diminué	2 Mort ou maigre	2 Molle	Fort	Entre 2" et 30"	2 Œil enfoncé	2 Non	2 Clair	2 Toux bronchique sonore fréquente	2 Accélérée	2 Stable
3 Très diminué	3 Ne se lève pas	3 Liquide	3 Absent	3 Plus de 30"	3 Œil très enfoncé	3 ?	3 Clair, abondant	3 Toux bronchique sonore peu fréquente	3 Coup de flanc	3 Dégradation
4	4 Coma	4 Très liquide		4	4		4 Epais, jaunâtre ou	4 Toux pulmonaire sourde fréquente	4 ?	4 Mort
		5 Absence					5 ?	5 Toux pulmonaire sourde peu		

Annexe 5 : Questionnaire sur les facteurs de risque

NOM ELEVAGE :

EDE :

VILLE :

CODE POSTAL :

Mail :

NOM VETO :

CODE POSTAL :

VILLE :

❖ Type animaux prélevés :

- Filière :
- Races :

❖ Calendrier vêlage :

- Période vêlage :
- Nombre de vêlage : hiver : printemps : été : automne :
- Période prélèvements :

❖ Situation sanitaire :

- Nombres de cas Diarrhées et/ou respi : n-1 10j-3sem : ; n 10j-3sem : ; n-1 3sem-3m : ; n 3sem-3mois : ; n-1 3m-8m : ; n 3m-8m :
- Mortalité : n-1 10j-3sem : ; n 10j-3sem : ; n-1 3sem-3m : ; n 3sem-3mois : ; n-1 3m-8m : ; n 3m-8m :
- Traitements préventifs :
 - Vaccination contre les diarrhées :
 - Traitement coccidiose :
 - Traitement cryptosporidiose :
 - Traitements autres des veaux (autres ou API) :
 - Statut BVD du troupeau :

❖ Microbisme & contamination :

- Bâtiment :
 - Stabulation libre avec les mères :
 - Cases ind (âge max/nb de cases) :
 - Cases coll (âge min/nb de cases/nb vx max par cases) :
 - Séparation par classe d'âge :
 - Surface totale/veau :
 - Paillage :
 - Curage :
 - Désinfection :
 - Vide sanitaire > 3sem :
 - Autre système :
- Abreuvement & distribution lait :
 - Abreuvement lieu :
 - Abreuvement source :
 - Abreuvement analyse :
 - Abreuvement traitement :
 - Propreté des abreuvoirs :
 - Distribution lait :

NOM ELEVAGE :

NOM VETO :

VILLE :

EDE :

CODE POSTAL :

VILLE :

CODE POSTAL :

Mail :

- Conditions de vêlage :
 - Vêlage en pâture :
 - Vêlage au bâtiment :
 - % en aire de vêlage spécifique :
 - Temps passé en aire de v spé :
 - Propreté de l'aire :
 - Paillage de l'aire :
 - Curage de l'aire :
 - Désinfection de l'aire :
 - Produit de désinfection utilisé :
 - Vide sanitaire > 3sem :

- Nurserie spécifique :
 - Nurserie/veau uniquement :
 - Nurserie/veau+mère :
 - Nb jour isolement après disparition des symptômes :
 - Paillage nurserie :
 - Curage nurserie :
 - Désinfection nurserie :
 - Vide sanitaire nurserie > 3sem :

- ❖ Achats et quarantaine :
 - Achats dans les veaux prélevés :
 - Réalisation d'une quarantaine lors d'achats :

- ❖ Colostrum :
 - Colostrum de la mère :
 - Colostrum du commerce :
 - Colostrum autre élevage :
 - Administration colostrum :
 - Surveillance aide colostrum :
 - Délai naissance – 1^{ère} prise colostrale :
 - L de colostrum dans les 6h :
 - Complémentation en OE des vaches :
 - Complémentation en OE des veaux :

- ❖ Localisation :
 - Autres animaux :
 - Autres exploitations à proximité :

Annexe 6 : Aperçu du fichier excel rassemblant les données des questionnaires et des résultats de recherche de *cryptosporidium* par PCR

The screenshot shows the Microsoft Excel interface with the following elements:

- Top Ribbon:** Enregistrement automatique, Accueil, Insertion, Mise en page, Formules, Données, Révision, Affichage, Aide.
- Search Bar:** Rechercher
- Right Ribbon:** Partager, Commentaires, Analyse de données, Édition (Trier et Rechercher et filtrer > sélectionner >), Cellules (Insérer, Supprimer, Format), Styles (Mettre sous forme de tableau >, Styles de cellules >), Mise en forme conditionnelle >
- Main Data Table:**

N	O	P		Q		R		S		T					
		Automne	Hiver	Printemps	Été	Automne	Hiver	Printemps	Été	Automne	Hiver	Printemps	Été		
		veleges automne previsionnels	veleges hiver previsionnels	veleges automne realises	veleges hiver realises	veleges printemps previsionnels	veleges ete previsionnels	veleges automne realises	veleges hiver realises	veleges printemps realises	veleges ete realises	veleges automne realises	veleges hiver realises	veleges printemps realises	veleges ete realises
1															
2	PERIODE ACTUELLE														
3	hiver	16	9	16	4										
4	hiver	16	9	16	4										
5	hiver	16	9	16	4										
6	hiver	16	9	16	4										
7	hiver	16	9	16	4										
8	automne/hiver	68	46	68	35										
9	automne/hiver	68	46	68	35										
10	automne/hiver	68	46	68	35										
11	automne/hiver	68	46	68	35										
12	automne/hiver	68	46	68	35										
13	hiver	22	14	22	4										
14	automne	21	16	21	0										
15	automne	21	16	21	0										
16	automne	54	31	54	0										
17	automne	10	8	10	0										
18	automne	10	8	10	0										
19	automne	10	8	10	0										
20	automne	10	8	10	0										
21	automne	10	8	10	0										
22	hiver	15	39	15	32										
23	hiver	15	39	15	32										
24	hiver	15	39	15	32										
25	automne/hiver	67	51	67	51										
26	automne/hiver	67	51	67	51										
27	automne/hiver	67	51	67	51										
28	automne/hiver	67	51	67	51										

Nom : Toukmidine

Prénom : Kenza

Titre : Etude des facteurs de risques de la cryptosporidiose chez les jeunes nouveau-nés en élevages Bretons

Résumé : La cryptosporidiose est une maladie parasitaire qui touche principalement les veaux et qui est responsable de l'apparition de diarrhée néonatales, le plus souvent en association avec d'autres pathogènes. C'est une maladie d'impact sanitaire et financier d'ordre mondial. Les facteurs de risque propres à cette maladie restent encore peu connus. Cette étude expérimentale s'est intéressée aux facteurs de risque de la cryptosporidiose dans les élevages bretons atteints ou non de cryptosporidiose. Pour cela des fèces ont été prélevés chez des veaux diarrhéiques et des veaux sains à proximité. La recherche de *cryptosporidium* a été réalisée par immunochromatographie (test rapide de terrain) puis par PCR. En parallèle des enquêtes sur les conditions d'élevage ont été réalisées auprès des éleveurs inclus dans l'étude. Les données récoltées ont été traitées par analyse multivariée afin d'identifier les facteurs de risque significatifs. Parmi les facteurs étudiés, le seul facteur associé de manière statistiquement significative à une diminution du pourcentage de veaux positifs en PCR à *cryptosporidium* est l'administration de colostrum par sondage ou par tétée.

Mots clés : *Cryptosporidium*, cryptosporidiose, veaux, diarrhée, facteurs de risque

Title : Study of the risk factors of cryptosporidiosis in young newborns in Brittany farms

Abstract : Cryptosporidiosis is a parasitic disease of calves which is responsible for the occurrence of neonatal diarrhoea, most often in association with other pathogens. It is a disease of global health and financial impact. The risk factors specific to this disease are still poorly understood. This experimental study focused on the risk factors for cryptosporidiosis in farms of Brittany (France) with and without cryptosporidiosis. For this purpose, faeces were collected from diarrheic and healthy calves. The detection of *cryptosporidium* bovis was carried out by immunochromatography (rapid test) and then by PCR. At the same time, farm surveys on the rearing conditions were carried out among the farmers included in the study. The data collected was processed by multivariate analysis in order to identify significant risk factors. Of the factors studied so far, the only one significantly associated with a decrease in the percentage of calf positif at *cryptosporidium* by PCR was the administration of colostrum by probing or suckling.

Keywords : *Cryptosporidium*, cryptosporidiosis, calves, diarrhea, risk factors