



HAL
open science

De la caractérisation génétique et phénotypique de *Cryptosporidium* (Alveolata : Apicomplexa) à la mise en évidence du rôle de *C. parvum* dans l'induction de néoplasie digestive

Gabriela Certad

► **To cite this version:**

Gabriela Certad. De la caractérisation génétique et phénotypique de *Cryptosporidium* (Alveolata : Apicomplexa) à la mise en évidence du rôle de *C. parvum* dans l'induction de néoplasie digestive. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT : . tel-00339175

HAL Id: tel-00339175

<https://theses.hal.science/tel-00339175>

Submitted on 17 Nov 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Droit et Santé de Lille 2

Thèse

Pour l'obtention du

**DOCTORAT DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2**

Spécialité : Parasitologie

**De la caractérisation génétique et phénotypique de
Cryptosporidium (Alveolata : Apicomplexa)
à la mise en évidence du rôle de *C. parvum* dans
l'induction de néoplasie digestive**

Par

Gabriela CERTAD

Directeur de thèse : **Docteur Eduardo DEI-CAS**

Soutenue le 30 septembre 2008 devant le jury :

Docteur Gordon Langsley (Laboratoire de Biologie Cellulaire comparative des Apicomplexes, Département de Maladies Infectieuses, Institut Cochin, Paris, France)

Professeur Jean Dupouy-Camet (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Cochin, Paris, France)

Professeur Isabelle Villena (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre National de Référence Toxoplasmose, Hôpital Maison Blanche, Reims, France)

Docteur Simone Caccio (Department of Infectious, Parasitic and Immune Mediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italie)

Professeur Colette Creusy (Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Group Hospitalière de l'Université Catholique de Lille, France)

Docteur Eduardo Dei-Cas (Ecologie du Parasitisme, Institut Pasteur de Lille, et Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalière Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, Lille, France)

Institut Pasteur de Lille-Laboratoire d'Ecologie du Parasitisme

« Le fait bien réel que les animaux, par la peine qu'ils endurent dans les expériences, contribuent tellement à diminuer la souffrance de l'humanité, indique que nous devrions forger une nouvelle et unique solidarité entre eux et nous. Pour cette seule raison, il incombe à chacun d'entre nous de faire le bien pour toute forme de vie non-humaine... La pitié pour les animaux si souvent confondue avec du sentimentalisme, devrait devenir un mandat auquel tout être rationnel ne pourrait échapper. Quand tous les sacrifices que la nécessité nous imposent seront-ils entrepris avec chagrin? »

Albert Schweitzer

Prix Nobel de la paix en 1952.

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Aux membres du jury

À M. le Docteur Eduardo Dei-Cas

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et pour avoir encadré ce travail. Merci pour votre disponibilité. Merci aussi de m'avoir encouragée tout au long de cette aventure qui a commencé un jour à Caracas, quand, par hasard, nous avons parlé de la possibilité de faire une thèse au sujet de la caractérisation génotypique du *Cryptosporidium* au Venezuela. Vous m'avez transmis votre passion pour la recherche en montrant toujours le même enthousiasme, aussi bien quand nous cherchions des renards dans la forêt que lorsque nous discutons des critiques à l'encontre de l'un ou l'autre de nos articles.

À M. le Docteur Gordon Langsley

Recevez toute l'expression de ma reconnaissance pour avoir aimablement accepté de présider ce jury et pour le grand intérêt que vous avez porté à ce travail.

À M. le Professeur Jean Dupouy Camet

C'est avec une certaine émotion, par la nature de nos origines communes, le Venezuela, que je vous présente mes sincères remerciements pour avoir accepté de consacrer un peu de votre temps à rapporter mon travail de thèse.

À Mme le Professeur Isabelle Villena

C'est également avec simplicité, que je vous remercie sincèrement d'avoir consacré du temps avec patience et compréhension à rapporter le présent travail.

À Mme le Professeur Colette Creusy

Je tiens à vous remercier doublement. D'abord de juger ce travail de thèse, mais aussi pour m'avoir transmis votre savoir et votre expérience dans le domaine de l'histopathologie et pour avoir identifié avec enthousiasme la lésion néoplasique qui a donné à notre recherche une tournure singulière. Sans vos nombreuses images microscopiques, ma thèse ne serait certainement pas la même.

À M. le Docteur Simone Caccio

C'est avec sincérité et simplicité que je vous exprime ma profonde reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en ayant accepté de vous déplacer et de participer au jury de cette thèse.

Au labo :

Je tiens à remercier vivement **Karine Guyot** pour toutes les leçons scientifiques qu'elle m'a données. Karine, j'admire en toi ton amour de la précision. Les nombreuses choses que j'ai apprises à ton côté ont facilité le déroulement de ce travail tant d'un point de vue pratique qu'au moment de la rédaction.

Il y a trois ans, quand je suis arrivée au labo, **Tramy Ngouanesavanh** était en train d'imaginer un nouveau modèle d'expérimentation animale. Grand merci pour avoir partagé ce projet. Il faut croire que tout arrive toujours pour de bonnes raisons. Cette aventure nous a transformées en « crypto-sisters ». Cela n'aurait pas été possible autrement, car sans aucun doute, nous formions une bonne équipe. Nous avons acquis une amitié sincère qui, je l'espère, durera au-delà du « Crypto » et en dehors de l'activité scientifique.

Je remercie **Nausicaa Gantois** toujours prête à rendre service. Ton dynamisme, ton efficacité, ton éternelle bonne humeur font que nous tous (parasitologues et champignologues) à « Ecopa » pouvons compter sur toi pour toutes les manips. Et aussi pour rire ou simplement courir sous la pluie sans même nous en rendre compte.

Je remercie de tout mon cœur **Magali Chabé**. Tu es une magicienne, capable de transformer mon « francagnol » en beau français. Merci pour tous les encouragements et pour me transmettre toujours ton optimisme sur n'importe quel sujet. Surtout, merci pour ton amitié.

Je remercie **Emilie Frealle**. Merci d'avoir partagé avec moi tes pensées et ta philosophie de vie. Finalement tu m'as fait comprendre que, parfois, un article non accepté peut être plus utile qu'un article accepté. En plus, j'ai trouvé génial de partager avec toi « la souffrance » qu'on éprouve dans la dernière ligne droite avant la fin de la thèse.

Je remercie **Anna Martinez**. Merci pour ta gentillesse et tous tes encouragements d'après-midi. Bon courage et bonne continuation avec ta thèse.

Je remercie **Valérie Conseil**. Merci de t'être consacrée à notre projet « Crypto-cancer » avec ce profond engagement, même si cela a impliqué quelquefois de manger des frites froides à 4 heures du matin.

Je remercie également **El-Moukhtar Aliouat** d'avoir trouvé à chaque fois dans son agenda très chargé, le temps de nous donner des conseils sur l'expérimentation animale et en microscopie électronique.

Je tiens à remercier très sincèrement les autres membres de l'équipe Ecologie du Parasitisme qui m'ont soutenue durant toutes ces années avec leurs conseils et leur aide : Merci à **Cécile Marie Aliouat, Laurence Delhaes, Christine Demanche, Annie Vitse, Jérôme Follet, Ourida Ghelboun** et à tous ceux que j'ai peut-être oubliés. Que ceux-ci me pardonnent ! Spécialement un grand merci à **Valérie, Laurence** et **Mag** pour être des « champignologues » qui se sont mis au service du projet « Crypto-cancer ».

Et à l'animalerie :

Je remercie **Thierry Chassat** pour son aide précieuse. Merci de nous avoir appris toutes les techniques spéciales pour la manipulation des petites SCIDs. Tu nous as aidés énormément dans ce travail par tes conseils en expérimentation animale. Par ton implication inconditionnelle dans notre projet « Crypto-cancer » tu es devenu un vrai « Ecopien ».

Je tiens également à remercier de tout mon cœur **Anthony Mouray**. Merci pour tous tes efforts pour nous trouver à chaque fois, même dans les demandes de dernières minutes, non seulement la quantité adéquate de souris SCID, mais aussi l'isolateur précis. Je veux te dire aussi que tu as eu l'idée géniale et salvatrice d'isoler chaque souris dans tes petites cages jaunes. C'est sûr que Nico et toi pouvez breveter votre système de « transport de souris automatisé inter-animalerie ».

« Nico le sopalin, Nico il faut rentrer de l'eau, Nico il faut bouger l'isolateur, Nico les biberons... ». Je remercie vivement **Nicolas Flament** pour son aide pendant tous ces mois. Merci de m'avoir appris tous les « petits trucs » des souris, et surtout pour tous tes efforts à essayer de me faire rire même dans les moments les plus tragiques (la moitié des souris mortes au milieu de l'expérience, pour ne citer qu'un exemple). Nico tu as mis une ambiance de travail toujours gaie et agréable. Thank you very much for being there !

Merci aussi à tous les autres membres du plateau d'expérimentation animale, spécialement: **Jean Pierre Decavel, Emile Fleurbaix** et **Bruno Couvreur**.

Et aussi:

Je remercie bien tout le personnel du Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de l'Hôpital Saint Vincent de Paul de Lille. Je souhaite remercier tout particulièrement **Laurence Fleurisse** pour sa précieuse collaboration et pour avoir toujours trouvé le temps de se consacrer à la recherche malgré son horaire très chargé.

Je souhaite exprimer ma gratitude à **Anthony Pinon**. Merci beaucoup pour ta disponibilité de tous les instants et pour avoir trouvé la formule mathématique « magique » pour valider notre nombre de souris SCIDs.

Merci à toutes les « biopuces » avec qui l'on a fait les dépannages entre labos ou plus simplement avec qui l'on a partagé un repas, un café ou un pot. Merci à **David, Ludo, Erwan, Christophe, Stéphanie** et à tous les autres qui sont déjà partis, pour avoir contribué à l'ambiance toujours agréable du deuxième étage.

Muchas gracias a todos los miembros de la Cátedra de Parasitología de la Escuela de Medicina « José María Vargas » de la UCV. **Luz, Leo, Alfredo, Aurora, Elsy, Giuseppe, Isbelia, Yolanda, Rosaura y René**, sin su apoyo incondicional ultramar y su paciencia, este trabajo no hubiera sido posible.

Comme Francis Bacon a dit « L'amitié double les joies et réduit de moitié les peines ». Je veux remercier **tous mes amis rencontrés pendant mon expérience franco-belge** et qui ont partagé les fous rires ainsi que les coups de bleus, en assurant le soutien affectif de ce travail. Mes remerciements les plus profonds vont également à **ma famille** pour le soutien permanent dans chacune de mes décisions et pour m'avoir donné la motivation d'aller toujours un peu plus loin.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE.....	7
I. RESUMES.....	12
RÉSUMÉ FRANCAIS.....	12
ABSTRACT.....	14
II. INTRODUCTION.....	17
III. REVISION BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
1. HISTORIQUE.....	19
1.1. <i>Cryptosporidium</i> : une découverte fortuite.....	19
1.2. <i>Cryptosporidium</i> : un agent nocif ?.....	19
1.3. <i>Cryptosporidium</i> spp. à l'ère du sida.....	20
1.4. <i>Cryptosporidium</i> spp., agents d'épidémies.....	21
2. POSITION TAXONOMIQUE.....	22
2.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.: des coccidies atypiques.....	22
2.2. Taxonomie du genre <i>Cryptosporidium</i>	23
2.3. Structure génétique des populations de <i>Cryptosporidium</i>	28
2.4. <i>Cryptosporidium</i> à l'ère post-génomique.....	30
3. BIOLOGIE.....	30
3.1. Cycle biologique.....	30
3.2. Morphologie des différents stades évolutifs de <i>Cryptosporidium</i>	33
4. POUVOIR PATHOGENE DU GENRE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	35
5. IMPACT DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> EN SANTÉ PUBLIQUE.....	37
5.1. Epidémiologie mondiale.....	37
5.1.2. Epidémiologie dans des régions développées et en développement.....	39
5.1.2.1. En France.....	39
5.1.2.2. En Haïti.....	41
5.1.2.3. Au Venezuela.....	41
5.1.2.4. En Iran.....	42
5.2. Présentation clinique de la cryptosporidiose.....	42
5.2.1. L'infection humaine.....	42
5.2.1.1. Manifestations cliniques chez l'homme en fonction des espèces.....	43
5.2.2. L'infection animale.....	45

5.2.2.1. Manifestations cliniques chez l'animal en fonction des espèces	45
5.3. Anatomie pathologique.....	46
5.4. Immunologie.....	47
5.5. Diagnostic de la cryptosporidiose.....	47
5.6. Traitement et nécessité de développer des molécules efficaces	48
6. PARASITES ET NEOPLASIE.....	50
6.1. Protozoaires	50
6.1.1. Le cas de <i>Theileria</i> spp.....	50
6.1.2. <i>Cryptosporidium</i> et néoplasie.....	52
6.2. Les trématodes.....	52
7. DES MEILLEURS OUTILS POUR LES RECHERCHES SUR LA CRYPTOSPORIDIOSE SONT NÉCESSAIRES	55
7.1. La culture <i>in vitro</i>	56
7.2. Modèles animaux.....	57
7.2.1. Modèle souris	57
7.2.2. D'autres modèles animaux	60
IV. OBJECTIFS ET STRATÉGIES	65
1. OBJECTIFS	65
2. STRATÉGIES D'APPROCHE.....	65
V. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	67
1. RECHERCHES EPIDEMIOLOGIQUES	67
1.1. Collecte des échantillons	67
1.2. Détection microscopique par la coloration de Zielh-Neelsen modifiée.....	68
1.3. Concentration par immunoséparation magnétique	69
1.4. Marquage immunofluorescent	69
1.5. Extraction d'ADN.....	69
1.6. PCR nichée	70
1.7. PCR Laxer	72
1.8. Purification de produits amplifiés.....	72
1.9. Analyse de RFLP.....	73
1.10. Séquençage	73
1.11. Microsatellite	73
1.11.1. Classification des Genotype multiloci (GML), variabilité et structure génétiques des populations.....	74
1.11.1.1. Méthode phénétique : visualisation par dendrogramme	74

1.11.1.2. Analyse de la variabilité génétique	74
1.11.1.3. Tests de génétique des populations	75
2. MODÈLE ANIMAL.....	75
2.1. Souris.....	75
2.2. Parasites.....	76
2.3. Immunodépression (pour les groupes concernés).....	77
2.4. Inoculation.....	77
2.5. Suivi de l'infection.....	77
2.6. Étude clinique.....	78
2.7. Étude histopathologique.....	78
2.8. Etude immunohistochimique.....	81
VI. RESULTATS.....	83
1. DONNÉES SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE.....	83
1.1. Venezuela.....	83
1.1.1. Article 1.....	83
1.1.2. Article 2.....	89
1.2. France et Haïti.....	95
1.2.1. Article 3.....	95
1.3. Iran.....	101
1.3.1. Article 4.....	101
2. UNE DECOUVERTE : L'INDUCTION DE NEOPLASIE GASTRO-INTESTINALE PAR <i>C. PARVUM</i> ..	105
2.1. Souris SCID sous dexaméthasone : Etude de lésions histologiques associées a l'infection par <i>C. parvum</i>	105
2.1.1. Article 5.....	105
2.2. Modèle souris SCID sous dexaméthasone : effet de la taille de l'inoculum sur les lésions néoplasiques induits par <i>C. parvum</i>	118
2.2.1 Article 6.....	118
3. DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE MURIN DE CRYPTOSPORIDIOSE : TEST DE SUSCEPTIBILITE A DIVERSES ESPECES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	140
3.1. Le modèle souris SCID sous dexaméthasone.....	140
3.1.1. Article 7.....	140
VII. DISCUSSION.....	161
1. EPIDÉMIOLOGIE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE.....	161
2. NÉCESSITÉ D'ASSOCIER L'ÉTUDE PHÉNOTYPIQUE AUX ÉTUDES D'ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	164

3. DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE ANIMAL : POURQUOI LA SOURIS SCID ? POURQUOI LA DEXAMÉTHASONE ?.....	165
3.1. Espèces se développant dans ce modèle	165
3.2. Avantages et inconvénients du modèle souris scid sous dexaméthasone	166
4. <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> ET NÉOPLASIE DIGESTIVE	167
4.1. Les faits.....	167
4.2. Les hypothèses sur les mécanismes	170
4.2.1. Cancer et parasites.....	171
4.2.2. Virus ?	172
5. IMPACT POTENTIEL DE NOTRE DÉCOUVERTE EN SANTÉ HUMAINE.....	173
VIII. CONCLUSION	174
IX. PERSPECTIVES	176
X. BIBLIOGRAPHIE	178
XI. ANNEXES	196

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal
AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
ANOFEL : Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicale
ARNm : Acide ribonucléique messenger
BALB : Bagg Albino
CACO 2 : Cellules épithéliales humaines
C57BL : C57 Black
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CSL : Circumsporozoïte –like
CPV : *C. parvum* virus
Dex : Dexaméthasone
DHEA : Déhydroépiandrostérone
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GML : Génotype multiloci
HAART : Highly active antiretroviral therapy ; Traitement antirétroviral hautement actif
HRT : Human rectal tumor
HT29.74 : Cellules humaine de carcinome du colon
ID50 : Dose infectieuse 50%
IFN gamma : Interféron gamma
IMS : Immunomagnetic separation ; Séparation immunomagnétique
InVS : l'Institut de Veille sanitaire
JNK : c-Jun NH2-terminal kinase
NFκB : Facteur nucléaire κB
NK : Natural killer
NO : Oxyde nitrique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate-buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PK-10 : Porcine kidney
PVP : Polyvinylpyrrolidone
RFLP : Restriction fragment length polymorphism ; Polymorphisme de longueur de fragment de restriction
rRNA : Ribosomal ribonucleic acid ; Acide ribonucléique ribosomal
SCID : Severe combined immunodepression
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
TRAP : Thrombospondin-related adhesive protein
T84 : Cellules humaine de carcinome du colon
UCV : Universidad Central de Venezuela
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

I. RESUMES

RESUME FRANCAIS

Le genre *Cryptosporidium* (Alveolata:Apicomplexa) comprend des espèces qui infectent le tractus gastro-intestinal d'un grand nombre de vertébrés (l'homme compris). Celles-ci sont la cause de la cryptosporidiose, maladie opportuniste émergente avec un impact considérable chez le patient immunodéficient, notamment sidéen. Ces protistes infectent aussi des sujets immunocompétents dans toutes les latitudes, en provoquant des diarrhées en général autorésolutives. Les oocystes hébergeant les sporozoïtes infectants sont éliminés avec les selles des hôtes infectés, contaminent l'environnement, sont fréquemment véhiculés par les eaux où ils gardent leur pouvoir infectieux pendant longtemps, résistant aux désinfectants usuels. Par ailleurs, étant immédiatement infectieux après leur excrétion, ils peuvent être transmis à un nouvel hôte directement par contact avec un individu infecté.

Habituellement non prescrite avec l'examen coproparasitaire conventionnel, la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* est rarement pratiquée chez les patients diarrhéiques. De plus, la morphologie étant insuffisante à la distinction des espèces dans le genre, leur identification, qui fait appel à des méthodes moléculaires, est rarement pratiquée, notamment dans les pays en développement. Cependant, elle constitue le seul moyen de déterminer les sources, les voies et les mécanismes de l'infection, informations essentielles au développement de stratégies rationnelles de prévention.

Pour toutes ces raisons, nous avons dans un premier temps cherché à caractériser la variabilité génétique des espèces et de sous-espèces de *Cryptosporidium* dans différentes régions : Venezuela, France, Haïti et Iran. Au Venezuela, chez 397 patients avec un statut VIH/SIDA confirmé, notre étude a révélé que l'infection par *Cryptosporidium* est fréquente parmi les patients vivant à Caracas. L'infection, dont la prévalence augmente avec l'âge, s'associe fréquemment à une diarrhée (plus de 5 selles par jour) et à une perte de poids, un taux de CD4+ <100 cellules/mm³ pouvant être considéré comme un facteur de risque prédictif de cryptosporidiose. Dans une autre étude plus récemment, la caractérisation génotypique (PCR-RFLP ciblant l'ADNr 18S de *Cryptosporidium* sp.) a permis d'identifier trois espèces de *Cryptosporidium* chez des

patients vénézuéliens VIH+: *C. hominis*, *C. parvum* et *C. canis*. Le génotypage multiloci, qui ciblait des mini- et microsatellites, a autorisé une résolution à niveau infra-spécifique. Les échantillons de *C. hominis* présentaient une même combinaison d'allèles. Nous avons effectué des études semblables en France, en Haïti et en Iran. Globalement, la structure génétique des populations de ces parasites montre une prédominance clonale, malgré l'existence d'un stade sexuel obligatoire dans leur cycle biologique des *Cryptosporidium* spp. L'origine géographique et l'espèce hôte ont un rôle structurant. En Iran, trois espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées parmi les échantillons fécaux de 15 personnes et 9 animaux: *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis*.

La seconde partie de ce travail décrit le développement d'un modèle murin immunodéprimé, représenté par des souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency), traitées par la dexaméthasone. Ce modèle, destiné à caractériser les isolats de *Cryptosporidium* spp. sur le plan phénotypique, a révélé des divergences marquées entre *C. parvum* et *C. muris*. L'étude histopathologique a confirmé la localisation gastrique (préférentiellement fundique) de *C. muris*. Les souris SCID sous dexaméthasone inoculées avec *C. parvum* ont développé des néoplasies intraépithéliales iléo-caecales de haut grade à partir du 35^{ème} jour post-inoculation. Des néoplasies intraépithéliales de haut grade ont été observées aussi au niveau de l'estomac (souris sous dexaméthasone), principalement dans la zone antrale. Chez les souris non traitées par la dexaméthasone euthanasiées 57 jours après l'infection, la parasitose était associée à une néoplasie de bas grade dans l'estomac. Globalement, nos expériences ont montré que *C. parvum* induit des néoplasies intra-muqueuses de bas et de haut grade dans l'estomac, le duodénum, le caecum et autres régions du côlon. Un tiers des souris présentait des lésions néoplasiques dans plus d'un organe. Les espèces *C. hominis*, spécifique de l'homme, et *C. molnari*, du poisson, ne se sont pas développées chez la souris SCID, traitée ou non par la dexaméthasone, tandis que les deux souches de *C. parvum* testées (IOWA et TUM1), se sont bien développées dans notre modèle et les deux induisirent les modifications néoplasiques gastro-intestinaux.

Ce travail apporte un modèle expérimental hautement reproductible de cryptosporidiose, fournit des nouvelles informations sur la diversité génétique de *Cryptosporidium* dans plusieurs régions du monde, évalue des différences biologiques entre espèces et démontre, pour la première fois, la capacité de *C. parvum* à induire des

processus néoplasiques chez l'hôte immunodéprimé. Cette découverte majeure accroît significativement l'intérêt scientifique des *Cryptosporidium* spp et suggère que l'impact de ces parasites en santé humaine et animale pourrait être beaucoup plus grand que ce que l'on croit.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis represents a major public health problem. This infection, caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*, has been reported worldwide as a frequent cause of diarrhoea, and its prevalence varies according to different regions. In developed countries, massive *Cryptosporidium* food-borne and waterborne outbreaks have been reported. In developing countries, *Cryptosporidium* affects mostly children under five. Furthermore, cryptosporidiosis remains a clinically significant opportunistic infection in immunocompromised patients, causing potentially life-threatening diarrhoea, especially in HIV-infected persons. Additionally, these parasites not only infect humans, but also cause morbidity in farm animals. Life cycle includes sporulated oocysts which come into the environment through the feces of the infected host. They contaminate food and water. Most transmission occurs apparently through recreational water. *Cryptosporidium* has also entered drinking water supplies, causing major outbreaks in cities around the world. Infection occurs when the oocysts are ingested by a suitable host. Without medical prescription, *Cryptosporidium* detection is not done as a routine, and the observation of the morphology of the parasite is not enough to establish differences between species. For that reason molecular techniques have been developed to differentiate this parasite at the species and genotype levels, and several methods have been used to study and characterize different parasite strains.

Because the knowledge about molecular epidemiology is important to the better understanding of the parasite infection, in the first part of this work we characterized the genetic variability of species and subspecies of *Cryptosporidium* in different regions: Venezuela, France, Haiti and Iran. A cross-sectional study was undertaken to determine the prevalence of cryptosporidiosis and its clinical and laboratory pattern in Venezuelan HIV-infected patients. At enrollment, they underwent thorough clinical history and physical examination and provided stool specimens for the identification of *Cryptosporidium* sp. and other parasites. *Cryptosporidium* sp. was identified in 15%. This infection was strongly associated with acute and chronic diarrhea, weight loss,

CD4⁺ counts below 100 cells/mm³, older age in patients with leukopenia, and more than 5 stools per day when CD4⁺ counts were below 100 cells/mm³. We characterized stool specimens from other Venezuelan HIV infected patients using nested PCR–RFLP and sequencing tools. Three species of *Cryptosporidium* were identified among these patients on the basis of the 18S rDNA locus: *C.hominis*, *C.parvum*, and *C.canis*. In this study, five *C.hominis* samples were sub-genotyped with micro- and minisatellite markers. For four of them, the same combination of alleles was found. We also studied the population genetic structure of *Cryptosporidium* spp. in France and Haiti. In the two areas under study, clonality was predominant, even if some sub-populations exhibited panmixia. Clonal genotypes are considered to be stable in space and time and thus can provide efficient tools for the identification of infection sources or transmission routes. Then, in order to define efficient prevention and control strategies, biology and clinical features of genetically well-defined parasite populations have to be explored. Isolates of *Cryptosporidium* spp. from human and animal hosts in Iran were also characterized on the basis of both the 18S rRNA gene and the Laxer locus. Three *Cryptosporidium* species, *C.hominis*, *C.parvum*, and *C.meleagridis*, were recognized, and zoonotically transmitted *C.parvum* was the predominant species found in humans. To contribute to the comprehension of the dynamics of infection and to investigate biological divergence between different populations of *Cryptosporidium*, culture tissue and animal models have been used. It has been difficult to find suitable models for cryptosporidiosis, as most mammals are susceptible to infection only as newborns. However, some *Cryptosporidium* species can be propagated in either chemically or genetically immunosuppressed mice. Efforts are still needed to develop reproducible animal models allowing both the routine passage of different species and approaching unclear aspects of *Cryptosporidium* infection, especially pathophysiology. For this reason, in the second part of this work we developed a model using adult severe combined immunodeficiency (SCID) mice inoculated with *Cryptosporidium parvum* or *Cryptosporidium muris* while treated or not with Dexaméthasone (Dex) in order to investigate divergences in prepatent period, oocyst shedding or clinical and histopathological manifestations. *C. muris*-infected mice showed high levels of oocyst excretion, whatever the chemical immunosuppression status. Parasite infection was restricted to the stomach, and had a clear preferential colonization for fundic area in both groups. Among *C. parvum*-infected mice, Dex-treated SCID mice became chronic shedders. *C. parvum*-inoculated mice

treated with Dex developed glandular cystic polyps with areas of intraepithelial neoplasia. To further characterize *Cryptosporidium* induced neoplastic cell transformation, SCID mice treated with Dexaméthasone were challenged with different doses of *C. parvum* oocysts and euthanatized sequentially after infection for histological examination. Our previous results were confirmed, and it was also found that mice infected with higher inoculums experienced more severe infections. Additionally, neoplastic changes were observed not only in the caecum but also in the stomach and duodenum of some animals. Then, we performed other animal experiments to determine whether other strains of *C. parvum* or other *Cryptosporidium* species were able to propagate in our model of SCID mice treated with Dex and to induce the development of premalignant or malignant lesions. Two *C. parvum* strains (IOWA and TUM1) develop well in SCID mice and induced the gastro-intestinal neoplastic changes. In contrast, fecal and histological specimens from infected mice treated or not with Dex were negative for either *C. molnari*, from fishes or *C. hominis*, an apparently stenoxenic species from humans.

On the whole, the present work described a highly reproducible experimental model of cryptosporidiosis, provided new data on the genetic diversity of *Cryptosporidium* species in many world regions, assessed biologic divergence between *Cryptosporidium* species, and demonstrated, for the first time, the ability of *C. parvum* to induce gastro-intestinal neoplasia in immunosuppressed hosts.

II. INTRODUCTION

Le genre *Cryptosporidium* comprend des espèces qui infectent l'intestin d'un grand nombre de vertébrés, y compris l'homme. Elles sont la cause de la cryptosporidiose, maladie opportuniste émergente avec un impact considérable chez le patient immunodéprimé, notamment sidéen. Ces protistes infectent aussi des sujets immunocompétents dans toutes les latitudes, en déterminant des diarrhées en général auto-résolutives. Les oocystes hébergeant les sporozoïtes infectants sont éliminés avec les selles des hôtes infectés, contaminent l'environnement, sont fréquemment véhiculés par les eaux où ils gardent leur pouvoir infectieux pendant longtemps, résistant aux désinfectants usuels. Par ailleurs, étant immédiatement infectieux après leur excrétion, ils peuvent être transmis directement par contact inter-humain.

Sans prescription spécifique, rare dans les faits, la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* n'est pas pratiquée lors de l'examen de coprologie parasitaire conventionnel. De plus, la morphologie étant insuffisante à la distinction des espèces de ce genre, leur identification, qui fait appel à des méthodes moléculaires, est rarement pratiquée, notamment dans les pays en développement. Cependant, cette identification constitue le seul moyen de déterminer les sources, les voies et les mécanismes de l'infection, informations essentielles au développement de stratégies rationnelles de prévention.

L'étude de la taxonomie de *Cryptosporidium* peut être utile pour l'identification de parasites qui infectent l'homme, pour l'évaluation de la signification en santé publique de *Cryptosporidium* chez les animaux et dans l'environnement, et pour mieux comprendre des sources d'infection et de contamination. Tout ceux-ci favorisera la compréhension de la transmission et de l'épidémiologie de l'infection, et aussi le développement des mesures préventives pour réduire au minimum l'exposition aux infections.

Les marqueurs micro- et minisatellitaires se sont avérés être des outils puissants pour identifier les génotypes de *Cryptosporidium* et pour évaluer le degré d'échange génique entre eux. Les résultats obtenus récemment par différentes équipes de recherche ont montré que la structure génétique des populations des espèces de *Cryptosporidium*

est à prédominance clonale. Ces observations suggèrent aussi des rôles structurants de la géographie et de l'espèce hôte.

Pour toutes ces raisons, il nous est apparu intéressant d'effectuer une caractérisation génotypique et phénotypique des espèces de *Cryptosporidium* circulants dans différentes zones géographiques. Au cours du travail de thèse, le premier objectif était donc de caractériser la variabilité génétique des espèces de *Cryptosporidium* dans différentes régions dont le Venezuela. Rien à propos de ces facteurs n'était connu au Venezuela où la prévalence de l'infection symptomatique ou asymptomatique par *Cryptosporidium* dans les écoles primaires peut dépasser 50% d'après des données récentes (Miller *et al.*, 2003).

Parallèlement, étant donné le manque actuel de modèles animaux reproductibles de cryptosporidiose, nous nous sommes attelés à mettre au point un tel modèle, afin de mener à bien l'analyse phénotypique des différents isolats parasitaires, et d'étudier des aspects peu connus de l'infection par *Cryptosporidium*, comme sa physiopathologie. Pour cela, des souris SCID, qui sont déficientes en lymphocytes T et B (Mead *et al.*, 1994; Seydel & Stanley, 1996), traitées avec de la dexaméthasone ont été infectées par voie orale avec des oocystes de différentes espèces parasitaires (*Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, *C. hominis* et *C. molnari*).

Lors de l'analyse histologique des organes de ces souris, une découverte fortuite et surprenante a fait prendre à mon travail de thèse un axe nouveau. En effet, nous avons mis en évidence que la présence de *Cryptosporidium* était associée à une dysplasie de haut degré au niveau digestif. Pour la première fois, des résultats expérimentaux ont permis de montrer le rôle potentiel de *C. parvum* dans l'induction de carcinome gastro-intestinal.

III. REVISION BIBLIOGRAPHIQUE

1. HISTORIQUE

1.1. *CRYPTOSPORIDIUM*: UNE DECOUVERTE FORTUITE

Cent ans ont passé depuis qu'Ernest Eduard Tyzzer, parasitologue médical distingué de l'Université de Harvard à Boston, publia les premières observations sur *Cryptosporidium*. Ses publications ont défini la plupart de ce que nous connaissons actuellement sur la biologie et le cycle biologique du parasite (Tzipori & Widmer, 2008). Tyzzer a décrit la présence d'un parasite unicellulaire vivant dans les glandes gastriques de souris de laboratoire (*Mus musculus*) qu'il a nommé *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907). En 1912, il décrit, toujours chez la souris, l'espèce *C. parvum*. Il s'agit bien d'espèces distinctes car les oocystes sont de forme et taille différentes. En plus, *C. muris* est localisé au niveau des glandes gastriques alors que *C. parvum* est localisé dans l'épithélium intestinal (Ripert & Guyot, 2003). Tyzzer décrivit aussi des stades sexués et asexués chez le parasite, ainsi qu'un attachement aux cellules épithéliales gastriques de l'hôte par le biais d'un organelle spécialisé. Il détailla alors les caractéristiques permettant d'établir un nouveau genre de sporozoaires apparenté aux Coccidies : *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1910).

Équipé d'un microscope optique de l'époque, Tyzzer a identifié des oocystes et observé qu'à la différence d'autres coccidies, l'oocyste peut sporuler lorsqu'il est « attaché » à la cellule hôte, condition indispensable pour l'auto-infection. Bien que Tyzzer, sans microscopie électronique, n'ait pu observer la localisation précise de *Cryptosporidium*, il a conclu que le parasite qu'il pensait localisé en dehors de la cellule hôte se nourrissait de cette dernière grâce à l'organe d'adhésion. Il a fallu attendre les études utilisant la microscopie électronique en 1978 pour que l'existence des oocystes soit confirmée (Pohlenz *et al.*, 1978). La détection d'oocystes dans les selles est alors devenue la méthode principale de diagnostic de la cryptosporidiose.

1.2. *CRYPTOSPORIDIUM* : UN AGENT NOCIF ?

En 1955, la description de *C. meleagridis*, une nouvelle espèce colonisant les intestins de dindons (*Meleagris gallopavo*) est faite. Pour la première fois, l'association entre le parasite et des manifestations cliniques est établie (Slavin, 1955). Le parasite est cependant resté ignoré ou considéré comme un organisme commensal

jusqu'à sa reconnaissance, par les vétérinaires dans les années 70 comme responsable d'épidémies de diarrhées parfois mortelles dans les élevages de jeunes veaux (Panciera & W., 1971; Pohlenz *et al.*, 1978).

Les premiers cas humains ont été rapportés en 1976, un cas chez une personne immunocompétent (Nime *et al.*, 1976) et un cas chez un patient immunodéprimé (Meisel *et al.*, 1976). Depuis 1980, les cas n'ont cessé d'être diagnostiqués aussi bien chez les patients sidéens, chez lesquels la diarrhée est très sévère engageant le pronostic vital, que chez les immunocompétents chez lesquels la parasitose peut être asymptomatique ou donner une diarrhée aiguë atypique évoluant spontanément vers la guérison (Ripert & Guyot, 2003).

En 1980, Bird et Smith ont étudié sept cas de cryptosporidiose (Bird & Smith, 1980), dont six concernaient des patients immunodéprimés, et ont conclu que « quand les systèmes immunitaires fonctionnent correctement et qu'il n'y a aucun autre désordre gastro-intestinal, *Cryptosporidium* ne semble pas être un problème, et à ce titre, ce parasite peut être considéré comme parasite pathogène opportuniste ». Mais plus tard il a été montré que cette affirmation n'était que partiellement vraie; bien que les individus immunologiquement compromis deviennent chroniquement - et souvent fatalement - malades, des individus immunologiquement compétents peuvent aussi développer fréquemment une gastroentérite aiguë à cause du parasite (Tzipori & Widmer, 2008).

1.3. *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. A L'ERE DU SIDA

Depuis 1981, avec la pandémie du SIDA, des parasitoses intestinales déjà connues en médecine vétérinaire ont émergé en pathologie humaine, à savoir: la cryptosporidiose ou la microsporidiose. La particularité de ces parasitoses réside dans le fait que leur symptomatologie clinique, rencontrée aussi bien chez l'hôte immunodéprimé que chez l'hôte immunocompétent, n'est pas spécifique, et que la diarrhée est d'autant plus rebelle que le sujet est immunodéprimé.

Le premier cas de cryptosporidiose chez un homosexuel sidéen a été décrit en 1982 (Ma & Soave, 1983) et, en seulement un an, environ 50 cas furent rapportés (Ma, 1984).

L'infection chez les individus VIH+ ou au stade SIDA était chronique et elle pouvait même engager le pronostic vital. L'infection, le plus souvent gastro-intestinale,

pouvait aussi être retrouvée aux niveaux hépatobiliaire et respiratoire. Le lien avec le SIDA était si fort que la cryptosporidiose est devenue l'un des critères définissants du SIDA (CDC, 1993).

En raison de l'utilisation étendue de la thérapie anti-rétrovirale, le nombre de cas de cryptosporidiose parmi les individus avec VIH/SIDA dans le monde développé s'est abaissé considérablement entre 1997 et 2007. En reconstituant la fonction immunitaire, cette thérapie semble également réduire le taux d'infection parasitaire. Mais la cryptosporidiose demeure encore une complication sérieuse du VIH/SIDA chez les patients dans les pays en voie de développement sans accès à la multithérapie (Pozio & Morales, 2005).

1.4. *CRYPTOSPORIDIUM* SPP., AGENTS D'ÉPIDÉMIES

Les épidémies de cryptosporidiose touchent les pays développés comme les pays en voie de développement, en zone aussi bien urbaine que rurale (O'Donoghue, 1995; Fayer, 1997; Ramirez *et al.*, 2004). La majorité des épidémies de cryptosporidiose recensées ont une origine hydrique. De nombreuses épidémies ont été rapportées entre 1984 et 1999, principalement en Amérique du Nord, au Royaume-Uni et au Japon (Fayer *et al.*, 2000). C'est toutefois en 1993 qu'une surprenante épidémie à Milwaukee (Winsconsin, Etats-Unis) vint donner une impulsion majeure à la recherche sur ce parasite. Cette épidémie aurait touché plus de 400 000 personnes à la suite d'une contamination du réseau de distribution d'eau (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Près de 4400 hospitalisations furent nécessaires et il y eut 69 décès. Au Royaume-Uni et au Pays de Galles, entre 1992 et 2003, *Cryptosporidium* sp. a été trouvé impliqué dans 69% des épidémies de gastro-entérite infectieuse (Smith *et al.*, 2006). En France, des épidémies de cryptosporidiose ont été décrites (voir Section 5.1.2.1) (Beaudeau *et al.*, 2008). Des épidémies de cryptosporidiose d'origine alimentaire ont également été rapportées liées à divers aliments comme par exemple les jus de pommes, le lait, les oignons crus ou la salade de poulet (Smith *et al.*, 2007).

Depuis l'émergence de *Cryptosporidium* lié à la pandémie de SIDA, suite à l'épidémie de Milwaukee, et sous la forte impulsion des industries de l'eau, les études se multiplièrent afin de mieux comprendre la biologie du parasite, de développer des méthodes de détection, de définir une stratégie de prévention, et de mettre au point un traitement efficace (Guyot *et al.*, 2005).

2. POSITION TAXONOMIQUE

2.1. *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.: DES COCCIDIES ATYPIQUES

La position systématique de *Cryptosporidium* au sein des protistes est décrite dans le tableau N°1.

Tableau N°1. Position taxonomique du genre *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907

Classification	Caractéristiques biologiques
Eukaryota	Caractérisés principalement par des cellules possédant un noyau avec enveloppe nucléaire
Alveolata	Présence de vésicules sous membranaires (alvéoles)
Apicomplexa	Présence d'un complexe apical chez les formes invasives
Coccidiasina	Cycle biologique comprenant mérogonie, gamétogonie et sporogonie
Eucoccidiorida	Existence de mérogonie (Schizogonie)
Eimeriorina	Développement indépendant des macro- et microgamontes
Cryptosporidiidae	Cycle biologique monoxène. Oocystes contenant quatre sporozoïtes nus. Développement sous la bordure en brosse des cellules épithéliales colonisées.

D'après : (Current & Garcia, 1991; NCBI, 2008; Taxonomicon, 2008)

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont des protistes appartenant au phylum des Apicomplexa et au groupe des Coccidies, comprenant également par exemple, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria* ou *Theileria*. . Tous les membres du phylum Apicomplexa sont des parasites et ont tous des caractéristiques spécifiques liées au parasitisme, notamment, la présence dans leurs formes invasives d'un complexe apical lié à la locomotion et à l'invasion cellulaire. En dépit de caractéristiques partagées, les Apicomplexa ont également des divergences, comme la spécificité d'hôte, le tropisme pour différents tissus, et l'obligation dans certains cas de se développer chez plus d'un

hôte pour compléter leur cycle biologique. Les hémospories, telles que *Plasmodium*, et les piroplasmes comme *Theileria* et *Babesia*, infectent des cellules sanguines et sont transmis aux vertébrés par des arthropodes hématophages. La plupart des hémospories traversent différents tissus pendant les étapes multiples de leur développement (Templeton *et al.*, 2004a).

En revanche, *Cryptosporidium* et les grégaires ont une stratégie de développement apparemment plus simple. Ce sont des parasites monoxènes qui envahissent principalement un seul type cellulaire, les cellules épithéliales intestinales (Templeton *et al.*, 2004a). *Cryptosporidium* a été déjà décrit comme une coccidie atypique. Barta *et al.*, dans une révision en 2006, ont regroupé toutes les différences significatives entre *Cryptosporidium* et les autres coccidies. Par exemple, *Cryptosporidium* est considéré comme un parasite intracellulaire mais extra-cytoplasmique. Contrairement aux autres coccidies, *Cryptosporidium* présente un organelle d'attachement à la cellule hôte et deux types d'oocystes peuvent être distingués: les oocystes à paroi épaisse et les oocystes à paroi fine. Ces derniers libèrent leurs sporozoïtes dans l'intestin et sont responsables d'un cycle d'auto-infection (Barta & Thompson, 2006). Le parasite diffère également des autres Apicomplexa par son absence d'apicoplaste (Abrahamsen *et al.*, 2004). De plus, le transfert de gènes, à partir d'un endosymbionte, mais également le transfert horizontal de gènes à partir d'un autre organisme a aussi été évoqués (Huang *et al.*, 2004). En effet, l'analyse du génome de *C. parvum* a mis en évidence des gènes d'Archea, eubactéries, algues et plantes absents chez autres Apicomplexa (Huang *et al.*, 2004).

2.2. TAXONOMIE DU GENRE *CRYPTOSPORIDIUM*

En 1942, Mayr a considéré une espèce comme des groupes de populations naturelles réellement ou potentiellement interféconds, reproductivement isolées d'autres groupes semblables » (Mayr, 1942). Cette définition peut-elle s'appliquer aux sous population de *Cryptosporidium*?

Bien que la découverte de *Cryptosporidium* remonte déjà à un siècle, c'est seulement après une vingtaine d'années que le monde médical et vétérinaire a considéré l'importance de cette parasitose dans leurs domaines respectifs. Même si le genre *Cryptosporidium* est maintenant bien reconnu par les scientifiques, la taxonomie du parasite au sein de ce genre soulève encore de nombreuses discussions.

Différents types d'analyses comme le Southern Blot (Ortega *et al.*, 1991), le Western Blot (Nina *et al.*, 1992) et les profils isoenzymatiques (Ogunkolade *et al.*, 1993) ont fourni les premières pistes pour montrer la grande hétérogénéité au sein du genre *Cryptosporidium*. De manière importante, ces études ont prouvé par exemple que l'infection par deux génotypes de *Cryptosporidium* était possible chez l'homme: un premier génotype exclusivement trouvé chez l'homme (aujourd'hui élevé au rang d'espèce et nommé *C. hominis*) et un second (élevé aussi au rang d'espèce et nommé *C. parvum*) apparemment identique à celui trouvé chez le bétail. Plus tard, l'application de différentes techniques moléculaires a confirmé la présence de ces deux sous-groupes chez *C. parvum* (l'espèce originellement décrite chez le bétail), qui ont été appelés « génotype humain » et « génotype bovin », ou « génotype H » et « génotype C » ou encore génotype 1 et génotype 2, respectivement. Ces observations, confirmées par de nombreux laboratoires, ont montré que deux types distincts de transmission du parasite pouvaient intervenir chez l'homme: une transmission inter-humaine, et une transmission zoonotique du parasite entre ruminants et humains (Tzipori & Widmer, 2008). Des observations sur les différences de pathogénicité entre *C. hominis* et *C. parvum* ont été confirmées par des études *in vitro*. Ainsi, à la différence de *C. parvum*, *C. hominis* n'est pas capable d'infecter des cellules intestinales primaires de bovin, suggérant qu'un tropisme pour les tissus de l'hôte conditionne l'infection par différentes espèces de *Cryptosporidium* pendant les étapes initiales de l'infection, peut être du à la interaction entre récepteurs ligands spécifiques (Hashim *et al.*, 2004).

Pour caractériser ces parasites, différentes études prennent en considération divers éléments autres que la morphologie ou la spécificité d'hôte, et ont permis de remarquer aussi l'importance des différences au niveau du site d'infection préférentiel, de l'infectivité des parasites, des critères biochimiques, des critères immunologiques, et des critères génétiques entre les différentes espèces de *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 2004).

Enfin, la taxonomie du genre *Cryptosporidium* est sujet de confusion pour différentes raisons (Xiao *et al.*, 2004) :

1. Les critères morphologiques, essentiels pour la désignation des genres et espèces chez les autres coccidies, se révèlent insuffisants pour différencier les espèces du genre *Cryptosporidium*. Par ailleurs, les oocystes de

différentes espèces de *Cryptosporidium* peuvent présenter des tailles et des structures similaires.

2. Le concept de spécificité étroite des espèces de *Cryptosporidium*, qu'on sait aujourd'hui erroné, a mené dans le passé à la dénomination de plus de vingt espèces. Mais des études d'infections croisées ont montré que des isolats provenant de différents animaux pouvaient parfois se transmettre d'une espèce hôte à une autre.

Par la suite, la nécessité d'identifier les espèces présentant des risques pour l'homme et pour les animaux, va motiver le réexamen de la structure des espèces au sein du genre *Cryptosporidium*. Particulièrement, les outils moléculaires comme la Polymerase Chain Reaction (PCR), la Restriction Fragment Length Polymorphisme (RFLP), le Multilocus genotyping, le séquençage, etc., ciblant des séquences précises du génome de *Cryptosporidium* ont aidé à clarifier la taxonomie du genre en validant l'existence de plusieurs espèces (Xiao *et al.*, 2004).

Au cours de la 6^{ème} réunion « Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Disease » à l'institut Pasteur à Paris, en France, en 2002, une session intitulée « la Taxonomie du genre *Cryptosporidium* » a eu lieu. L'objectif de cette session était de réviser les critères les plus couramment employés pour nommer les espèces de *Cryptosporidium*. Le consensus entre les chercheurs a été que, pour nommer des nouvelles espèces de *Cryptosporidium*, quatre conditions de base devaient être remplies :

1. Une étude morphométrique des oocystes (taille, forme, structure des différents stades de développement).
2. Une caractérisation génétique (analyses des séquences nucléotidiques de différents gènes).
3. L'étude du spectre des hôtes naturels et l'analyse de la spécificité d'hôte naturelle ou expérimentale lorsque cela est possible.
4. La conformité aux règles de l'« International code of zoological nomenclature » (Xiao *et al.*, 2004).

Toutefois, il est évidemment difficile de définir une nouvelle espèce sur tous ces critères à la fois.

Dans le tableau N° 2 se trouve la liste des espèces de *Cryptosporidium* considérées actuellement comme valides selon les critères évoqués ci-dessus.

Tableau N°2. Liste des espèces de *Cryptosporidium* considérées comme valides

Espèce	Hôtes principaux	Présence chez l'homme	Principaux sites d'infection	Associé à pathologie	Taille des oocystes (µm)	Référence
<i>C. andersoni</i>	Bovin domestique	Oui	Estomac	Oui	7,4 x 5,5	(Lindsay <i>et al.</i> , 2000)
<i>C. baileyi</i>	Poulet	Oui	Trachée, bourse de Fabricius, cloaque	Oui	6,3 x 5,2	(Current <i>et al.</i> , 1986)
<i>C. bovis</i>	Bovin domestique	NR	Intestin	Non	4,9 x 4,6	(Fayer <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. canis</i>	Chien domestique	Oui	Intestin grêle	Oui	4,8 x 7,2	(Fayer <i>et al.</i> , 2001)
<i>C. fayeri</i>	Kangourou	NR	—	—	4,9 x 4,3	(Ryan <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. felis</i>	Chat domestique	Oui	Intestin grêle	Oui	4,6 x 4,0	(Iseki, 1979)
<i>C. fragile</i>	Crapaud	NR	Estomac	NR	6,2 x 5,5	(Jirku <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. galli</i>	Poulet domestique	NR	Proventricule	Oui	8,3 x 6,3	(Ryan <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. hominis</i>	Homme	Oui	Intestin	Oui	4,9 x 5,2	(Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002)
<i>C. macropodum</i>	Kangourou	NR	—	—	4,9 x 5,4	(Power & Ryan, 2008)
<i>C. meleagridis</i>	Dindon	Oui	Intestin	Oui	5,0 x 4,4	(Slavin, 1955)
<i>C. molnari</i>	Poisson (Dorade)	NR	Estomac	Oui	4,7 x 4,5	(Alvarez-Pellitero & Sitja-Bobadilla, 2002)
<i>C. muris</i>	Souris	Oui	Estomac	Oui	8,4 x 6,2	(Tyzzer, 1907)
<i>C. nasorum</i>	Poisson (licorne d'eau de mer)	NR	Intestin	—	4,3 x 3,3	(Hoover <i>et al.</i> , 1981)
<i>C. parvum</i>	Souris, bovin domestique, homme	Oui	Intestin grêle	Oui	4,9 x 4,4	(Tyzzer, 1912)
<i>C. ryanae</i> (ancien deer-like genotype)	Bovin domestique	NR	—	Non	3,7 x 3,16	(Fayer <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. saurophilum</i>	Lézard	NR	Intestine, muqueuse cloacale	Oui	5,0 x 4,7	(Koudela & Modry, 1998)

<i>C. serpentis</i>	Serpent	NR	Estomac	Oui	6,2 x 5,3	(Levine, 1980)
<i>C. suis</i>	Sanglier	Oui	Intestin	Non	4,6 x 4,2	(Ryan <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. scophithalmi</i>	Poisson (turbot)	NR	Intestin, estomac	Non	4,4 x 3,9	(Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. wrairi</i>	Cochon d'inde	NR	Intestin grele	–	5,4 x 4,6	(Vetterling <i>et al.</i> , 1971)

NR : non rapporté

Par contre, en raison d'une forte variation allélique intra-spécifique de *Cryptosporidium* dont on ne connaît pas encore l'impact taxonomique, de nombreux génotypes du parasite sont décrits, correspondant sans doute à des espèces encore cryptiques. Actuellement, l'identification et l'appellation des génotypes sont surtout basées selon la spécificité d'hôte. Quand des nouvelles différences significatives sont détectées dans les séquences nucléotidiques de *Cryptosporidium* par rapport aux données déjà connues, de nouveaux génotypes sont nommés et cela en fonction de l'hôte duquel ils ont été isolés. Même si les différences génétiques retrouvées chez les différents génotypes de *Cryptosporidium* tendent à être corrélées avec des différences biologiques, le degré de divergence est variable. Le terme sous-génotype est parfois employé pour décrire des variations intra-génotypiques relativement mineures (Xiao *et al.*, 2004). Dans certains cas, des génotypes de *C. parvum* ont été élevés au rang d'espèces sur la base de différences biologiques. Par exemple, *C. canis* chez le chien (Fayer *et al.*, 2001), *C. hominis* chez l'homme (Morgan-Ryan *et al.*, 2002), *C. suis* chez le porc (Ryan *et al.*, 2004) ou *C. ryanae* chez le bovin (Fayer *et al.*, 2008) avant d'être élevé au rang d'espèces, étaient apparentées respectivement aux génotypes chien, humain, porc, « deer like » de *C. parvum*.

2.3. STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS DE *CRYPTOSPORIDIUM*

L'étude de la structure génétique des populations naturelles de *Cryptosporidium* permet de déterminer si la structure est clonale (reproduction avec un faible taux de recombinaison génétique) ou panmictique (reproduction avec un fort taux d'échanges génétiques) (Tibayrenc, 1995b). Cette question est importante car la fréquence des échanges génétiques dans la population conditionne la stabilité des génotypes dans l'espace et dans le temps. En effet, dans une population de structure panmictique, ou proche de la panmixie, les échanges génétiques sont fréquents, et de ce fait, l'instabilité

des géotypes multiloci rend leur utilisation difficile pour des études d'épidémiologie moléculaire. Par contre, si les échanges génétiques sont rares ou absents, les lignées parasites évoluent indépendamment des unes des autres et se comportent comme des clones naturels. La clonalité permet donc de définir des marqueurs épidémiologiques, ainsi que des marqueurs indirects de virulence, d'infectiosité, ou de résistance aux médicaments (Tibayrenc, 1998).

La génétique des populations est un domaine relativement nouveau chez *Cryptosporidium*. Les premiers résultats relatifs au sujet ont été publiés par l'équipe de Mallon en 2003 (Mallon *et al.*, 2003b). Ces auteurs ont utilisé des marqueurs mini- et microsatellites pour déterminer, par analyse du déséquilibre de liaison, une structure génétique complexe parmi des populations de *Cryptosporidium* présentes en Écosse (Mallon *et al.*, 2003b). Ainsi, parmi les populations de *C. parvum* infectant les hommes et le bétail à Aberdeenshire en Ecosse, les analyses montrent qu'une large population de *C. parvum* comprend à la fois des isolats d'origine humaine et animale. Ce groupe de *C. parvum* a une structure panmictique et ne présente pas de déséquilibre de liaison, suggérant que les échanges génétiques ont lieu fréquemment (Mallon *et al.*, 2003b). Ainsi, de nouveaux types peuvent émerger comme le résultat d'une recombinaison sexuelle pendant l'infection concomitante à deux types de *C. parvum*, comme il a été précédemment démontré par l'infection expérimentale de souris avec différents types de *C. parvum* (Feng *et al.*, 2002).

Au contraire, un déséquilibre de liaison significatif a été observé entre 14 marqueurs micro-et mini-satellites chez 61 isolats bovins en Israël et en Turquie. Une ségrégation géographique significative des types de *C. parvum* a été trouvée à la fois dans les deux pays, puisque des géotypes multiloci distincts sont souvent identifiés dans des troupeaux séparés (Tanriverdi *et al.*, 2006). Même dans une population à structure clonale, des populations de *C. parvum* génétiquement distinctes pourraient émerger au sein d'un groupe d'hôte en un temps relativement court (Tanriverdi *et al.*, 2006). En Écosse cependant, Mallon *et al.* n'avaient pas réussi à mettre en évidence une structuration géographique ou temporelle des populations. Mais dans leur étude, qui reposait sur des isolats provenant du sud et du nord du pays, la dispersion géographique n'était probablement pas suffisante pour observer un tel effet. Dans les études écossaises de Mallon *et al.*, deux populations de *C. parvum* sont retrouvées exclusivement chez

l'homme. Ainsi, la transmission de *C. parvum* à l'hôte humain ne serait pas uniquement d'origine zoonotique mais aussi apparemment anthroponotique. Tanriverdi *et al* posent l'hypothèse que les animaux et les hommes d'une même région géographique portent des populations distinctes de *C. parvum* et ainsi l'effet structurant de l'espèce hôte conduit à l'émergence d'espèces et génotypes de *C. parvum* adaptés à l'hôte (Tanriverdi *et al.*, 2006). Les résultats obtenus au Royaume Uni (Leoni *et al.*, 2007) vont également dans ce sens. Enfin, cette hypothèse est également supportée par des arguments statistiques dans les travaux très récents de Grinberg et Pomroy (Grinberg & Pomroy, 2007).

2.4. *CRYPTOSPORIDIUM* A L'ERE POST-GENOMIQUE

La publication du génome complet de *C. parvum* (Abrahamsen *et al.*, 2004) et de *C. hominis* (Xu *et al.*, 2004) représente une étape importante et significative dans notre compréhension de la biologie ces parasites. Avant l'accomplissement de cet effort, notre connaissance du génome de *Cryptosporidium* était rudimentaire. La disponibilité d'un génome complet, et la facilité d'accès à cette information par la base de données de CryptoDB.org (Puiu *et al.*, 2004) représentent un saut de géant dans la recherche sur cet organisme. Comme exemple des avancées récentes ainsi engendrées, on peut citer les nouvelles informations sur le métabolisme des nucléotides de *C. parvum* (Striepen *et al.*, 2004), l'identification de séquences régulatrices (Mullapudi *et al.*, 2007) et une meilleure compréhension de la biogénèse de la paroi des oocystes (Templeton *et al.*, 2004b).

3. BIOLOGIE

3.1. CYCLE BIOLOGIQUE

(D'après Current & Garcia, 1991 ; Fayer, 1997)

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont de parasites monoxènes, c'est-à-dire à un seul hôte. La forme de résistance et de dissémination est l'oocyste, excrété avec les fèces des sujets infectés. Pour que le cycle parasitaire (Figure N° 1) soit initié, l'hôte doit ingérer des oocystes infectants renfermant quatre sporozoïtes. Après l'ingestion, l'oocyste se excyste sous l'action de la trypsine et des sels biliaires bien que ces sels ne seraient pas indispensables, libérant ses 4 sporozoïtes, éléments infectants. L'exposition de l'oocyste aux sels biliaires, bien que pouvant favoriser l'excystation, ne lui semble pas

indispensable. L'excystement en absence de sels biliaires permettrait d'expliquer l'infection de sites extra-intestinaux comme le tractus respiratoire.

Les sporozoïtes sortent de l'oocyste et se déplacent par glissement grâce à leur système microtubulaire pour arriver au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin. Les sporozoïtes présentent alors leur complexe apical à la membrane entérocytaire. Ils sont progressivement recouverts par la membrane plasmique des cellules épithéliales. Logés dans la vacuole parasitophore ainsi formée, ils acquièrent une position atypique: intracellulaire et extra-cytoplasmique. Ce stade parasitaire internalisé est appelé trophozoïte.

Le cycle de développement comporte deux mérogonies ou schizogonies ou multiplications asexuées, suivies de la gamétogonie. Le trophozoïte donne naissance à un merozoïte de type I contenant huit cellules filles ou mérozoïtes de type I. Ces huit mérozoïtes de 1^{ère} génération vont infecter les cellules voisines et auront alors deux destins possibles: soit donner naissance à de nouveaux merozoïtes de type I (recyclage), soit initier une mérogonie de 2^{ème} génération ou type II (qui donnera des mérozoïtes de type II). Ces derniers, qui sont 4 par merozoïte II, initient la reproduction sexuée ou gamétogonie. Pour cela, ils se différencient soit en microgamonte mâle, soit en macrogamonte femelle. Les microgamontes deviennent multinucléés, chaque noyau étant ensuite incorporé dans un microgamète. Les macrogamontes demeurent uninucléés en devenant de macrogamètes. La fécondation a lieu suite à l'union des macrogamètes et des microgamètes. Celle-ci aboutit à la formation de zygotes qui deviennent des oocystes. Ces derniers sont émis sporulés dans la lumière intestinale, rejetés avec les fèces dans le milieu extérieur et sont directement infectants pour un autre hôte sensible.

Les particularités du cycle de *Cryptosporidium* par rapport à celui des autres coccidies consistent en l'excrétion d'oocystes directement infectants, le recyclage des mérozoïtes de 1^{ère} génération et la formation d'oocystes à paroi fine (20%) qui desenkystent immédiatement *in situ* (non éliminés avec les selles), entretenant l'infection. Ces particularités expliqueraient le maintien de l'infection chez les sujets immunodéprimés.

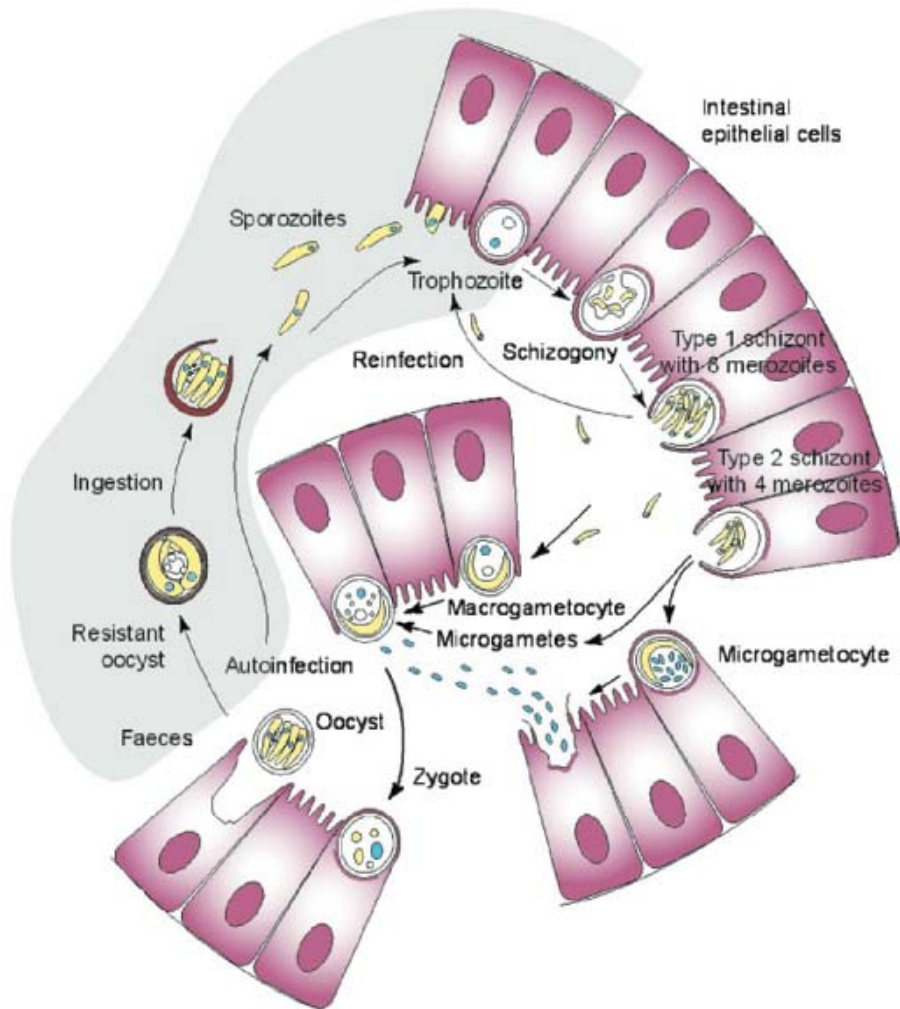


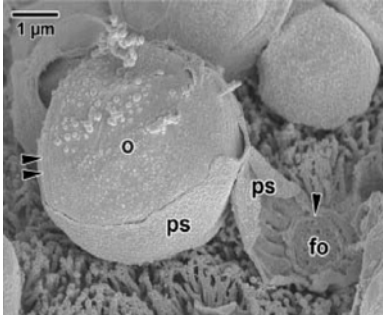
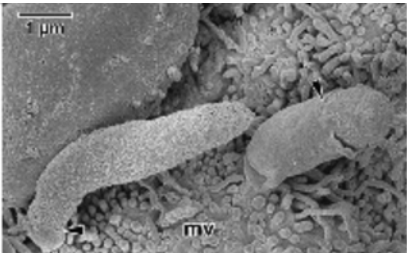
Figure N°1. Cycle biologique de *Cryptosporidium* sp.

D'après Smith *et al* 2007

3.2. MORPHOLOGIE DES DIFFERENTS STADES EVOLUTIFS DE *CRYPTOSPORIDIUM*

Dans le tableau suivant (Tableau N°3) se trouve une description détaillée des différents stades évolutifs du parasite.

Tableau N°3. Morphologie des différents stades évolutifs de *Cryptosporidium*

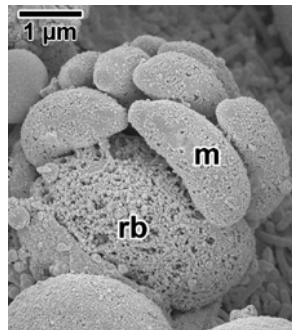
Formes évolutives	Images	Description
Oocystes o : oocyst ps : vacuole parasitophore (« parasitophorus sac ») fo : organelle nourricier (« feeder organelle »)		<ol style="list-style-type: none"> 1. Forme sphérique à ovoïde. 2. Leur diamètre varie entre 4 et 8 µm selon les espèces. 3. Chaque oocyste contient quatre sporozoïtes nus sans sporocystes, et présente un corps résiduel granuleux central très réfringent. 4. Leur paroi est composée de deux couches, interne et externe, bien distinctes. La couche externe, de densité électronique variable, est composée d'une matrice polysaccharidique. Cette matrice, où le glucose est le sucre prédominant, est immunogène et hautement résistante aux protéases. La couche interne est peu électrodense. Elle semble composée de glycoprotéines filamenteuses et pourrait contribuer à la robustesse et à l'élasticité de la paroi. 5. À l'un de leurs pôles, une structure unique semblable à une fente s'étend sur 1/3 à 1/2 de leur circonférence. Lors de l'excystation, l'ouverture de cette suture permet la libération des sporozoïtes.
Sporozoïtes et merozoïtes		<ol style="list-style-type: none"> 1. Ils sont élancés, virguliformes. 2. Formes libres et mobiles. 3. Présence d'un complexe apical. 4. Les rhoptries, les micronèmes, les granules denses, le noyau, les ribosomes, les microtubules ainsi que les anneaux apicaux sont visibles par microscopie électronique. 5. Il faut toutefois noter l'absence de mitochondrie, de conoïde et de micropores. 6. Lorsqu'ils se fixent à la cellule hôte, les microvillosités l'entourent et forment une vacuole parasitophore. Des changements au niveau de l'apex de la cellule hôte et dans le parasite mènent à la formation d'un organelle dit d'attachement ou nourricier.

Trophozoïtes



Ils possèdent un noyau unique proéminent et un organelle d'attachement/nourricier bien développé montré par la flèche sur l'image.

Mérontes

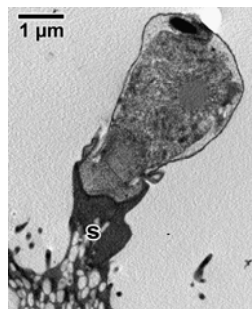


m : merozoïtes

rb : corps résiduel (« residual body »)

1. Un cycle de multiplication asexué (merogonie ou schizogonie), mène à la formation de mérontes de type I contenant chacun six à huit merozoïtes.
2. Les merozoïtes restent attachés à un corps résiduel par leur extrémité postérieure.
3. Une fois matures les merozoïtes se séparent du corps résiduel. La membrane cellulaire de l'hôte entourant le méronte se lyse et les merozoïtes deviennent extracellulaires, capables d'infecter d'autres cellules hôtes pour produire de nouveaux mérontes type I ou ils peuvent évoluer vers des mérontes type II à quatre merozoïtes.

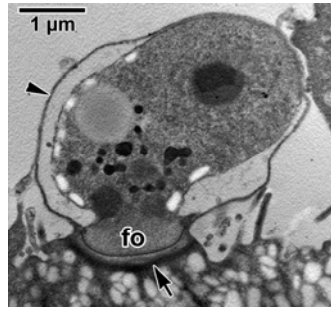
Microgamontes



s : (« stem »)

1. Ils ressemblent aux mérontes, mais contiennent des noyaux plus petits.
2. Des divisions nucléaires successives dans le microgamonte forment de microgamètes.
3. Chaque microgamète se forme par une protrusion nucléaire à la surface du gamonte.
4. Ils sont une forme en tige avec une extrémité antérieure aplatie.

Macrogamontes



fo : organelle nourricier
(« feeder organelle »)

1. Forme sphérique à ovoïde. Ils présentent en position centrale un grand noyau à nucléole proéminent.
2. Les microgamètes s'attachent par les bords de leur coiffe apicale à la surface des cellules comportant des macrogamètes, qu'ils fécondent pour produire un zygote, qui se développe ensuite en oocyste. Ils donnent naissance à un seul macrogamète.
3. Les microgamètes fécondent les macrogamètes pour produire un zygote qui évolue en oocyste

Images de microscopie électronique par transmission d'après Valigurova *et al.*, 2008 (Valigurova *et al.*, 2008). Description d'après Fayer, 1997.

4. POUVOIR PATHOGENE DU GENRE *CRYPTOSPORIDIUM*

Chez les hôtes humains ou animaux la sévérité de la cryptosporidiose est variable en fonction de leur susceptibilité (ex : espèce hôte, âge, statut immunitaire) et de la pathogénicité intrinsèque des isolats (Okhuysen & Chappell, 2002).

Des observations sur les différences de pathogénicité entre des isolats ont été faites chez des volontaires sains (Okhuysen *et al.*, 1999), ainsi que chez des patients sidéens (Cama *et al.*, 2007). Des études précédentes ont également démontré que certains isolats diffèrent dans leur capacité à infecter le veau et la souris. D'autres chercheurs ont observé des différences dans la composition en protéines de différents isolats (Mead *et al.*, 1990).

Une étude a été réalisée chez un groupe de volontaires en bonne santé exposés à des isolats de *C. parvum* de provenance diverse. Dans cette étude, l'ID50 (dose infectieuse 50%) a différé selon les isolats. Les observations cliniques ont suggéré que des isolats appartenant au même génotype mais obtenus à partir d'emplacements géographiques différents, avaient une infectiosité et une pathogénicité différentes (Okhuysen *et al.*, 1999). En fait, un certain nombre de facteurs sont susceptibles de contribuer à la pathogénicité de *Cryptosporidium*.

Comme mentionné précédemment, *C. parvum* est un parasite relativement peu envahissant qui se localise dans la bordure microvillositaire des entérocytes et se développe dans une vacuole parasitophore. Cette position caractéristique dans la cellule

hôte est qualifiée d'intra-cellulaire mais extra-cytoplasmique. Pourtant, ce parasite peut produire des anomalies significatives dans les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin. Ces altérations épithéliales sont probablement le résultat soit d'atteintes directes de la cellule épithéliale de l'hôte, soit des perturbations indirectes causées après recrutement de cellules et de cytokines proinflammatoires, soit des deux effets associés. Le résultat final serait la diarrhée (Okhuysen & Chappell, 2002).

Jusqu'ici les facteurs spécifiques de virulence de *Cryptosporidium* n'étaient pas bien connus. Néanmoins, certaines molécules candidates ont été identifiées par des méthodes immunologiques et moléculaires, et certains mécanismes associés à la pathogénicité ont été décrits. Ils sont les suivants :

1. **Adhérence:** Pour établir l'infection, l'étape initiale critique est l'attachement du parasite aux cellules hôtes. Récemment, plusieurs molécules probablement associées à l'adhérence ont été caractérisées comme par exemple le CSL (circumsporozoïte -like) (Riggs *et al.*, 1997), la gp900 (Barnes *et al.*, 1998), le complexe gp15/40/60 (Cevallos *et al.*, 2000; Strong *et al.*, 2000), TRAP-C1 et TRAP-C2 (thrombospondin related adhesion proteins) (Spano *et al.*, 1998), la cp47 (Nesterenko *et al.*, 1999) et la Cps 500 (Riggs *et al.*, 1999).
2. **Production de toxines:** La diarrhée est le symptôme le plus caractéristique de la cryptosporidiose, mais le mécanisme spécifique par lequel *Cryptosporidium* induit la diarrhée n'a pas été identifié. Des études précédentes ont postulé que *Cryptosporidium* produirait une entérotoxine responsable de la diarrhée sécrétoire profuse. Plusieurs observations soutiennent cette idée. La diminution du flux d'anions en présence d'inhibiteurs de cyclo-oxygénase a mené à l'hypothèse d'une activité potentielle entérotoxigène de *Cryptosporidium*. Celle-ci impliquerait la sécrétion des prostaglandines par les cellules épithéliales intestinales infectées (Okhuysen & Chappell, 2002).
3. **Lésions cellulaires :** En infectant des cultures en monocouche d'entérocytes avec *Cryptosporidium*, des altérations cellulaires ont été documentées comme la rupture des jonctions inter-cellulaires, la perte de la fonction barrière et la libération de lactate déshydrogénase intracellulaire

(Adams *et al.*, 1994). Les mécanismes impliqués dans la rupture des membranes pendant l'invasion de *Cryptosporidium* demeurent inconnus. Les phospholipases, les protéases, ou les hémolysines sont des molécules qui peuvent potentiellement altérer directement les tissus. Une protéine spécifique de *Cryptosporidium* pourrait être associée à l'invasion cellulaire et à la perte de fonction barrière. C'est l'hémolysine H4 codée par le gène *hemA* (Steele *et al.*, 1995).

4. **Apoptose** : Plusieurs groupes ont suggéré que *Cryptosporidium* était cytopathogène vis-à-vis des cellules épithéliales directement infectées mais également des cellules non infectées. En utilisant des cellules épithéliales biliaires en culture, Chen *et al* ont démontré que cet effet cytopathogène est lié à l'apoptose des cellules infectées et des cellules non infectées au moment de l'entrée du parasite dans la cellule (Chen *et al.*, 1999). McCole *et al* ont montré *in vitro* que *Cryptosporidium* pouvait favoriser l'apoptose au moment de l'entrée dans la cellule épithéliale et une fois installé, il peut produire une inhibition de l'apoptose par un mécanisme associé à l'activation du facteur nucléaire κ B (NF κ B) (McCole *et al.*, 2000). Mele *et al* après l'étude de *C. parvum* en culture de cellules HCT-8 ont observé que le parasite peut moduler l'apoptose en favorisant la mort programmée de celles-ci au moment de l'infection, et en inhibant l'apoptose après l'infection, afin probablement de faciliter sa croissance dans de cellules infectées. Plus récemment il a été montré que l'infection par *C. parvum* conduit à une surexpression de gènes codant pour des inhibiteurs de protéines de l'apoptose (IAPs) comprenant c-IAP1, c-IAP2, XIAP et survivin (Liu *et al.*, 2008).

5. IMPACT DE *CRYPTOSPORIDIUM* EN SANTE PUBLIQUE

5.1. EPIDEMIOLOGIE MONDIALE

La cryptosporidiose est une maladie cosmopolite. L'infection a été rapportée dans 95 pays de tous les continents et sous toutes les latitudes à l'exception de l'Antarctique (Ripert & Guyot, 2003). La prévalence de la cryptosporidiose chez les sujets

immunocompétents est estimée à 1-2 % en Europe, 0,6-4,3 % en Amérique du Nord, contre 3-20 % dans les pays en développement. Cette différence peut sans doute s'expliquer par les mauvaises conditions de vie associées à la qualité de l'eau, le manque d'hygiène, les mauvaises conditions d'habitation dans les pays en développement. La prévalence serait plus élevée pendant les mois les plus chauds et les plus humides de l'année (Ripert & Guyot, 2003; de Oliveira-Silva *et al.*, 2007; Nahrevanian & Assmar, 2008).

Chez l'homme, la sensibilité à l'infection dépend de l'âge, de l'état immunitaire du sujet, et de son état nutritionnel. De nombreuses études montrent une plus grande sensibilité et une plus grande fréquence de la cryptosporidiose chez les jeunes enfants de moins de 4 ans (Newman *et al.*, 1999; Bern *et al.*, 2000; Areeshi *et al.*, 2008). Chez les sujets atteints du SIDA, la cryptosporidiose peut être une manifestation inaugural du SIDA ou un critère d'aggravation de la maladie (Ripert & Guyot, 2003). Chez les animaux, l'infection est également plus commune chez les nouveaux nés (diarrhées néonatales) (Santin *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006; Santin *et al.*, 2008).

La malnutrition peut contribuer à augmenter la durée de la diarrhée à cryptosporidies et inversement les cryptosporidies peuvent prolonger la diarrhée chez les enfants malnutris (Sallon *et al.*, 1988). La prévalence de cryptosporidiose est également augmentée chez les enfants nourris au biberon par rapport à ceux nourris au sein (Mata *et al.*, 1984; Pape *et al.*, 1987).

La difficulté pour évaluer la fréquence réelle de ce parasitisme réside également dans le fait que la présence du parasite, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, ne s'accompagne pas toujours de diarrhée.

Il existe des facteurs fortement associés à la transmission de l'infection: la large distribution d'oocystes dans l'environnement, la résistance des parasites aux différents mécanismes d'inactivation physiques ou chimiques, la dose minimale infectante peu élevée, l'infection par le parasite d'une grande variété d'animaux (Joachim, 2004).

La principale voie de contamination est la voie féco-orale. Suite aux travaux de Tzipori *et al* (1980) qui montrèrent, par des expériences de transmissions croisées, le manque de spécificité de la plupart des espèces connues de cryptosporidies, la cryptosporidiose fut considérée comme une zoonose avec transmission directe de

l'animal à l'homme. Les animaux de rente et de compagnie furent alors considérés comme réservoirs de parasites et source de contamination pour l'homme. Ce mode de transmission n'explique pourtant pas à lui seul, les cas de cryptosporidiose observés dans les villes, où le contact avec les animaux est minime. Certains auteurs expliquèrent alors des cas de cryptosporidiose chez des enfants dans des crèches, ou chez des personnes hospitalisées, par la transmission d'homme à homme (Ripert & Guyot, 2003). C'est aussi une cause de diarrhée de voyageur (Ma *et al.*, 1985).

Avec les progrès réalisés pour rechercher les cryptosporidies dans l'environnement, il apparaît que le risque d'infection associé à la transmission zoonotique directe est sans doute de moindre importance par rapport au risque lié à la contamination par l'eau de boisson, bien que des animaux sauvages et domestiques soient d'importants réservoirs pour l'infection humaine et la contamination de l'environnement. Les matières fécales des animaux et des hommes infectés polluent l'environnement au travers des effluents d'élevage, des épandages sur les sols et des égouts (Naciri, 1992).

En fait, *Cryptosporidium* a plusieurs caractéristiques qui influencent sensiblement l'épidémiologie de l'infection: La dose infectante est basse, d'un à dix oocystes ; les oocystes sont immédiatement infectieux lorsqu'ils sont excrétés dans les fèces. En plus, les oocystes sont très stables et peuvent survivre dans l'environnement pendant des mois jusqu'à un an ou plus ; la dispersion des oocystes dans l'environnement peut entraîner la contamination de l'eau potable et de la nourriture (Caccio & Pozio, 2006).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classifié *Cryptosporidium* comme un pathogène d'importance en santé publique due à sa capacité d'infecter avec des très faibles doses d'oocystes, et à la résistance du parasite aux traitements d'eau conventionnels comme la chloration (O.M.S., 2006).

5.1.2. Epidémiologie dans des régions développées et en développement

5.1.2.1. En France

En France, peu de données épidémiologiques sont disponibles. Une étude multicentrique réalisée en 1995 chez des sujets sans symptômes digestifs a montré une prévalence de 0,32% chez 932 enfants de crèches hospitalières, de 0,36% chez 831 adultes non immunodéprimés et 3,1% chez 618 patients VIH+ sans distinction de stade

(Datry *et al.*, 2000). Plus récemment, une analyse génotypique a été réalisée sur 57 échantillons de selles de patients immunocompétents et immunodéprimés provenant de laboratoires de centres hospitaliers universitaires français, montrant que *C. parvum* et *C. hominis* sont les espèces majoritairement retrouvées en France (Guyot *et al.*, 2001). Mais d'autres espèces ont été identifiées aussi chez des sujets immunodéprimés: *C. meleagridis*, *C. felis*, et un nouveau génotype de *C. muris*, ceci indiquant que les individus immunodéprimés sont sensibles à un large éventail d'espèces et génotypes de *Cryptosporidium* (Guyot *et al.*, 2001).

En dehors de ces études, 3 épidémies liées à la contamination par *Cryptosporidium* de l'eau de distribution ont été identifiées: la première survenue à Sète en 1998 (Guyonnet, 1999), la deuxième à Darcy le fort en 2001 (Dalle *et al.*, 2003), et la plus récente à Divonne-les-Bains en 2003 (Gofti-Laroche & Schmitt, 2003). Elles ont touché respectivement environ 150, 483 et 800 personnes.

Les difficultés relevées dans les rapports d'investigation de ces épidémies sont convergentes avec les conclusions du rapport de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) (Afssa, 2002) qui préconisait plusieurs recommandations visant à améliorer les conditions de diagnostic, d'analyse épidémiologique et d'estimation du risque lié à la cryptosporidiose en France.

C'est dans ce contexte qu'en 2004, un réseau national français de laboratoires hospitaliers de Parasitologie s'est constitué sous l'égide de l'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicale (ANOFEL) et en partenariat avec l'AFSSA et l'Institut de Veille sanitaire (InVS) autour de la thématique *Cryptosporidium*. Son but était d'évaluer la prévalence de la cryptosporidiose humaine et de constituer une collection nationale d'isolats pour favoriser le stockage et la caractérisation génotypique des échantillons. À l'heure actuelle, ce réseau compte 37 laboratoires membres répartis sur l'ensemble du territoire.

De janvier 2007 à décembre 2007, 179 cas de cryptosporidiose ont été notifiés. L'analyse de données montre que 60% des cas sont survenus chez des patients immunodéprimés. L'analyse par groupe d'âge montre un pic dans la classe 0-4 ans. Le génotypage de 137 isolats montre la représentation majoritaire de *C. parvum* (53%) et *C. hominis* (43%), les autres espèces étant rares (Derouin, 2006-2007).

5.1.2.2. En Haïti

Les protistes opportunistes émergents sont au premier rang des préoccupations sanitaires en Haïti à cause du danger qu'ils représentent pour la santé publique, notamment pour les sujets immunodéprimés chez qui l'impact pathologique de la cryptosporidiose est d'autant plus inquiétant qu'aucun traitement spécifique efficace n'est actuellement disponible. Ce risque d'infection avec des opportunistes est particulièrement élevé en Haïti, pays le plus pauvre de l'hémisphère occidental, historiquement l'un des premiers dans le monde où l'épidémie du VIH s'est manifestée (Pape *et al.*, 1983).

On estime que 230 000 personnes vivaient avec le VIH aux Caraïbes en 2007 (dont environ trois quarts en Haïti et en République Dominicaine), alors qu'environ 20 000 personnes étaient nouvellement infectées par le VIH dans cette région et quelques 14 000 personnes décédaient du SIDA (ONUSIDA, 2008). *Cryptosporidium* sp est l'un des principaux agents de diarrhée chronique chez les adultes infectés par le VIH (Pape *et al.*, 1983) et chez les enfants âgés de moins de 2 ans et hospitalisés pour diarrhée aiguë (Pape *et al.*, 1987). Chez les sujets VIH+, *Cryptosporidium* sp reste le parasite le plus fréquent. Dans une étude récente réalisée à Port-au-Prince pour évaluer l'impact de *Cryptosporidium* chez les patients atteints du SIDA, les sujets contacts, et chez les enfants en bas âge, la présence d'oocystes de cryptosporidies a été montrée chez 158 personnes (soit une prévalence de 10,3%). Chez ces personnes, 56 adultes sur 57 (98%) et 7 enfants sur 36 (19%) étaient VIH+. Le génotypage a permis d'identifier trois espèces: 59% *C. hominis*, 38% *C. parvum* et 3% *C. felis* (Raccurt *et al.*, 2006).

5.1.2.3. Au Venezuela

Au Venezuela, la prévalence de l'infection symptomatique ou asymptomatique par *Cryptosporidium* dans les écoles primaires a été rapportée chez 89% des enfants dans l'état de Trujillo (Miller *et al.*, 2003), chez 8.8% de la population native dans l'état de Zulia où 60% des sujets sont porteurs asymptomatiques (Chacin-Bonilla & Sanchez-Chavez, 2000). L'infection par *Cryptosporidium* a été également retrouvée parmi 41, 3% des patients VIH dans l'état de Zulia (Chacin-Bonilla *et al.*, 1992), chez 4 à 8% des enfants avec diarrhée (Perez-Schael *et al.*, 1985). Ungar *et al* ont trouvé par la recherche d'anticorps IgG et IgM anti-*Cryptosporidium*, 19,8 % et 15,5% porteurs d'anticorps au Pérou et au Venezuela (Ungar *et al.*, 1988). Une étude comprenant 515 personnes a été

conduite plus récemment au Venezuela pour déterminer la prévalence et les facteurs de risque liés à la cryptosporidiose à l'île de San Carlos. L'infection à *Cryptosporidium* a été trouvée chez 13% de personnes. Variables fortement associées à un risque plus élevé de l'infection ($p < 0,01$) ont été contact avec les excréments dans des sols contaminés et des mauvaises conditions de vie (Chacin-Bonilla *et al.*, 2008). Dans ce pays, aucune identification d'espèce du parasite n'avait été réalisée avant ce travail de thèse.

5.1.2.4. En Iran

Dans une étude conduite dans le Sud-Est de l'Iran sur l'étiologie de diarrhées chez les enfants, la prévalence de la cryptosporidiose était de 7%. La diarrhée a duré sensiblement plus longtemps chez les patients atteints de cryptosporidiose par rapport à ceux avec une autre infection intestinale. Il y avait également une association significative entre l'infection par *Cryptosporidium* et la perte de poids chez les enfants (Hamedi *et al.*, 2005). Dans une autre étude de la prévalence des parasites intestinaux, réalisée chez 206 individus VIH+, *Cryptosporidium* a été trouvé chez 1,5% des personnes (Zali *et al.*, 2004). Plus récemment, à Téhéran, 214 patients de dix centres de santé ont été étudiés. Dans l'ensemble, 1,4% de tous les patients et 6,3% des patients diarrhéiques étaient infectés par *Cryptosporidium*. Deux cas de cryptosporidiose ont été trouvés chez des patients sidéens et un cas chez un patient avec une leucémie aiguë myéloïde. La maladie était chronique chez les patients immunodéprimés, et a causé la mort de deux personnes (Nahrevarian & Assmar, 2008). Avant la réalisation de ce travail de thèse, il n'existait pas d'information disponible concernant l'identification moléculaire des espèces de *Cryptosporidium* en Iran.

5.2. PRESENTATION CLINIQUE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE

5.2.1. L'infection humaine

Dans un certain nombre de cas, notamment au Venezuela comme nous venons de le voir, des infections asymptomatiques par *Cryptosporidium* ont été rapportées. Dans les autres cas, la clinique et la sévérité de l'infection peuvent changer considérablement d'une personne à une autre, dépendant surtout du statut immunitaire de l'hôte. Le symptôme le plus remarquable chez les personnes immunocompétentes est la diarrhée, habituellement volumineuse et aqueuse. Du mucus est parfois présent dans les selles mais le sang et les leucocytes sont rares. Les crampes abdominales, l'anorexie, les

nausées, les vomissements, la perte de poids, la fièvre et la fatigue peuvent occasionnellement accompagner la diarrhée (Fayer, 2004). Chez les personnes immunocompétentes, la durée moyenne de la maladie est de 12 jours. Celle-ci est auto-résolutive, sans aucun traitement spécifique (Ripert & Guyot, 2003).

Chez les patients immunodéprimés pour différentes raisons comme une malnutrition, une infection par le VIH, un cancer, etc., la durée et la sévérité de la cryptosporidiose dépend du niveau de l'immunosuppression. La cryptosporidiose, en tant que maladie opportuniste, se produit habituellement chez les patients présentant moins de 100 lymphocytes CD4+/mm³ (Navin *et al.*, 1999). Chez ces patients immunodéprimés, les infections peuvent devenir chroniques tant que l'immunodépression est maintenue, et représentent un risque vital. La cryptosporidiose peut être létale à cause des évacuations fréquentes, aqueuses et volumineuses conduisant à une déshydratation très importante. Dans certains cas, une dissémination de l'infection vers d'autres organes a lieu, par exemple, vers le foie, la vésicule biliaire, le pancréas et même vers l'arbre respiratoire (Fayer, 2004). Au niveau biliaire, le parasite a été mis en évidence dans la bile et serait incriminé dans la pathogénie des cholécystites aiguës. Les symptômes sont des nausées, des vomissements et un ictère avec élévation du taux de la phosphatase alcaline et de la bilirubine (Current & Garcia, 1991).

5.2.1.1. Manifestations cliniques chez l'homme en fonction des espèces

Les espèces les plus communément retrouvées chez l'homme sont *C. parvum* et *C. hominis*, avec une proportion relative variant sensiblement selon les régions géographiques. D'autres espèces comme *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. canis*, *C. suis* et *C. muris* ont été également retrouvées chez l'homme, aussi bien immunodéprimé qu'immunocompétent (Xiao *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007). Des cas d'infection multiple par deux voire trois espèces de *Cryptosporidium* ont été décrits chez des patients VIH+ (Cama *et al.*, 2006).

Il a été signalé que *C. hominis* est plus souvent associés à la douleur oculaire et articulaire, à la céphalée, et à la fatigue que *C. parvum* (Hunter *et al.*, 2004). Certains auteurs ont aussi signalé qu'un plus grand nombre d'oocystes de *C. hominis* est excrété dans les fèces par rapport à *C. parvum* (Xiao *et al.*, 2001a).

Dans une étude réalisée chez de patients VIH/SIDA, il a été observé que différents génotypes et sous génotypes de *Cryptosporidium* peuvent être associés à différentes manifestations cliniques. (Cama *et al.*, 2007). D'une part, les infections avec *C. hominis* du sous-type Id, *C. parvum*, *C. canis* ou *C. felis* peuvent sévèrement affecter les personnes VIH+. Dans ces cas, la diarrhée chronique peut mener à un « *wasting syndrome* ». Cette étude a également montré que des infections par *C. meleagridis* n'ont été associées à aucune manifestation clinique et que les personnes atteintes par cette espèce ont excrété moins de parasites que celles atteintes par d'autres espèces de *Cryptosporidium*. Chez les patients infectés par *C. hominis* du sous-type Id le risque de diarrhée était plus élevé, tandis qu'il était faible chez les sujets infectés avec le sous-type Ib. Enfin, le sous-type Ia n'a pas été associée à diarrhée (Cama *et al.*, 2007).

En raison de toutes les difficultés pour trouver des modèles appropriés pour l'étude de la cryptosporidiose, l'équipe de Chappell et Okhuysen a mis en place une série d'études chez des adultes volontaires sains pour tester les caractéristiques phénotypiques de différentes espèces et isolats de *Cryptosporidium*. Dans ces études expérimentales, après l'infection orale par *C. parvum*, il a été constaté que l'apparition de la diarrhée avait lieu entre les jours 4 à 7 après l'infection et durait de 4 à 7 jours. L'excrétion d'oocystes généralement commençait entre les jours 6 et 8 après le challenge, avec une durée de 3 à 8 jours. Ces études ont montré que différents souches (UCP, Iowa, TAMU) avaient des ID50s (dose infectieuse 50%) différents, indiquant des variations dans leur pouvoir infectieux pour l'homme. Il a été trouvé également que les personnes avec des anticorps préexistants contre *Cryptosporidium* présentaient une résistance relative à la réinfection par la souche Iowa (Chappell *et al.*, 1996; Okhuysen *et al.*, 1998; Okhuysen *et al.*, 1999; Okhuysen *et al.*, 2002). *C. hominis* (TU502) a été également testé et il a été constaté que cette espèce pouvait causer l'infection et la maladie chez des adultes sains d'une manière similaire à *C. parvum*. L'ID50 pour la souche *C. hominis* TU502 était entre 10 et 83 oocystes. Le fort pouvoir infectieux associé à TU502 était comparable à celui des isolats plus contagieux de *C. parvum* (TAMU et Iowa). Toutefois, une relation dose-réponse pour la diarrhée était évidente chez des volontaires infectés par *C. hominis*. Cela n'a pas été observé dans des études avec les oocystes de *C. parvum* (Chappell *et al.*, 2006).

5.2. 2. L'infection animale

La cryptosporidiose a été décrite chez de nombreuses espèces animales, aussi bien domestiques, sauvages que captives. Les animaux les plus jeunes semblent être les plus sensibles à l'infection et les plus susceptibles de développer une maladie tandis que les individus adultes restent la plupart du temps asymptomatiques (Ramirez *et al.*, 2004).

Au fur et à mesure que le nombre des cas d'infections humaines et animales augmentaient, l'intérêt pour *Cryptosporidium* chez l'animal s'est intensifié, non seulement parce que les animaux ont été considérés comme source d'infection pour l'homme, mais également parce que l'infection par ce parasite pouvait avoir des répercussions économiques chez les animaux de production (Ramirez *et al.*, 2004). La cryptosporidiose du bétail est aujourd'hui particulièrement surveillée en raison des préjudices économiques qu'elle peut entraîner. L'infection a été rapportée chez plus de 150 espèces de mammifères (Xiao & Fayer, 2008). Elle est aujourd'hui la première cause d'entérite diarrhéique des veaux nouveau-nés. Cette parasitose entraîne d'importantes pertes économiques chez les ruminants nouveau-nés de part la mortalité, la morbidité, les retards de croissance qu'elle entraîne et le coût des traitements des animaux (de Graaf *et al.*, 1999).

Cryptosporidium a été aussi isolé chez une variété d'animaux sauvages comme par exemple, les souris, les cerfs, les sangliers, les lapins, les renards, les écureuils, et les rats musqués. Chez tous ces animaux, les infections étaient asymptomatiques. Certains, en particulier les rongeurs, peuvent être retrouvés aussi dans des secteurs urbains, en augmentant ainsi le risque de transmission de l'animal sauvage à l'homme et aux animaux domestiques. Ces animaux sauvages partagent aussi leurs habitats avec des animaux de ferme, fournissant une source additionnelle pour la contamination de l'environnement et l'infection possible du bétail. Les animaux sauvages peuvent également contribuer à la contamination des eaux (Ramirez *et al.*, 2004).

5.2.2.1. Manifestations cliniques chez l'animal en fonction des espèces

Les résultats, obtenus en majorité en Amérique du Nord, mettent en évidence une distribution variable des espèces et génotypes de *Cryptosporidium* en fonction de l'âge des animaux. Aux Etats-Unis, trois études successives ont démontré que chez le veau laitier avant sevrage, *C. parvum* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée (85% des

isolats), qu'après le sevrage et chez les génisses, *C. bovis* et le génotype cervidé (reconnu aujourd'hui comme l'espèce *C. ryanae*), (Fayer *et al.*, 2008) deviennent les plus prévalents et enfin que chez l'animal adulte, *C. andersoni* (localisé dans la caillette) devient prédominant (Santin *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006; Santin *et al.*, 2008). Ces résultats sont confirmés par Feltus *et al.* (Feltus *et al.*, 2008).

Chez les petits ruminants, Ryan *et al* ont génotypé les oocystes excrétés par des ovins en Australie : la majorité des oocystes appartenaient au génotype cervidé et aucun à l'espèce *C. parvum* (Ryan *et al.*, 2005). Ces résultats sont confirmés par Geurden *et al* qui ont complété leur étude de prévalence chez l'agneau et le chevreau précédemment citée par une caractérisation moléculaire des isolats. Chez les agneaux, la quasi-totalité des isolats appartenait au génotype cervidé. Chez les chevreaux, 100% des isolats testés appartenaient à l'espèce *C. parvum* (Geurden *et al.*, 2008). Au Pérou, Cama *et al* ont pour leur part montré que des chèvres, âgées de 6 mois à 3 ans, hébergeaient des cryptosporidies du génotype cervidé (Cama *et al.*, 2008). Dans ces études *C. parvum* était la seule espèce associée à la diarrhée.

Ces résultats montrant des différences phénotypiques entre les espèces et sous-espèces de *Cryptosporidium*, réaffirment l'intérêt des outils moléculaires qui permettent l'identification de ces génotypes et des sous-types pour approfondir la connaissance sur la cryptosporidiose.

5.3. ANATOMIE PATHOLOGIQUE

L'organe de prédilection de *Cryptosporidium* est l'intestin, principalement l'intestin grêle, mais des infections sont aussi retrouvées dans le caecum, le colon et occasionnellement dans l'estomac et le duodénum. Le parasite va entraîner l'apparition d'un infiltrat de lymphocytes, plasmocytes et polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse, associé à un certain degré d'une atrophie des villosités. L'extension du parasitisme aux canaux biliaires, à la vésicule biliaire, au pancréas, au foie ou au poumon ne s'observe que chez l'hôte immunodéprimé (Ripert & Guyot, 2003).

Des études utilisant des modèles animaux ont décrit certaines modifications histologiques de l'épithélium intestinal induites par l'infection par *Cryptosporidium* comme l'atrophie villositaire et l'allongement des cryptes dans la partie proximale de l'intestin grêle (Heine *et al.*, 1984) ou dans le caecum et le côlon (McDonald *et al.*,

1992), avec hyperplasie cryptique et abcès des cryptes dans le gros intestin (Heine *et al.*, 1984), et fusion des villosités intestinales (Enemark *et al.*, 2003). Également, une colonisation gastrique par *C. parvum* (souche IOWA) a déjà été rapportée chez des souris génétiquement immunodéprimées (Mead *et al.*, 1994) ou immunodéprimées par l'administration de glucocorticoïdes (Rasmussen & Healey, 1992c). Toutefois, les auteurs n'ont pas mentionné d'altérations néoplasiques. Chez l'homme, des colonisations gastriques, bien que peu fréquentes, ont été rapportées aussi. Cette localisation particulière a été décrite principalement chez les patients immunodéprimés (Cersosimo *et al.*, 1992; Ventura *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1998; Rivasi *et al.*, 1999; Clemente *et al.*, 2000; Kourda *et al.*, 2008) mais également chez des individus immunocompétents (Ramsay *et al.*, 2007). Dans la plupart des cas, les parasites étaient observés dans la région antro-pylorique de l'estomac.

5.4. IMMUNOLOGIE

La prévalence plus élevée de cryptosporidiose chez les sujets plus jeunes, sa sévérité chez les immunodéprimés et sa guérison possible à l'arrêt d'un traitement immunosuppresseur suggèrent que la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle essentiel dans le control de l'infection (Ripert & Guyot, 2003). Spécifiquement, la sévérité de la maladie au cours de l'infection SIDA souligne l'importance de l'immunité cellulaire. Il a été montré que la sévérité de l'infection est croissante avec la diminution du nombre de lymphocytes CD4⁺ (Navin *et al.*, 1999). Il est possible d'implanter le parasite chez des animaux immunodéprimés génétiquement ou artificiellement (Voir section 7.2 Modèles animaux).

5.5. DIAGNOSTIC DE LA CRYPTOSPORIDIOSE

Les symptômes rencontrés dans les infections par *Cryptosporidium* spp. ne sont pas suffisamment spécifiques pour permettre de poser un diagnostic clinique différentiel valable. Il est donc nécessaire que celui-ci soit parasitologique ou biologique. Différentes techniques de coloration permettent de détecter *Cryptosporidium* spp. à partir des différents prélèvements (selles, liquide d'aspiration duodénales, biopsies, liquide de lavage bronchoalvéolaire, etc.). Néanmoins, la technique de référence est la coloration de Zielh Neelsen modifiée sur frottis obtenus directement ou après des techniques de concentration (Henriksen & Pohlenz, 1981). Les cryptosporidies apparaissent alors rose foncé ou rouge, contrastant avec le reste des matières fécales colorées en vert. Des tests

immunologiques ont été aussi mis en place afin de diagnostiquer l'infection : une capture de copro-antigènes est possible par la technique ELISA; ou un marquage des cryptosporidies par un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome (IFA). Toutefois, l'avènement des techniques moléculaires comme la PCR (PCR nichée, PCR-RFLP, Analyse microsatellite, etc.) a permis d'obtenir une meilleure sensibilité. Ces tests permettent aussi de faire la distinction entre les différentes espèces du parasite (Sunnotel *et al.*, 2006).

5.6. TRAITEMENT ET NECESSITE DE DEVELOPPER DES MOLECULES EFFICACES

Il n'existe pour le moment, aucun traitement spécifique réellement efficace contre la cryptosporidiose. Il est possible que plusieurs facteurs soient la cause de ce manque d'efficacité des médicaments existants, comme par exemple la localisation particulière (intracellulaire mais extra-cytoplasmique) du parasite dans la cellule de l'hôte qui empêche l'action de la drogue, mais aussi l'existence chez le parasite de protéines de transport ou de pompes d'efflux qui permettent le rejet des drogues hors du parasite (Caccio & Pozio, 2006).

De nombreuses substances ont été testées et la plupart se sont révélées inefficaces. Certaines substances parvenaient à réduire la multiplication du parasite, mais seulement à des doses toxiques. De même, quelques substances actives chez l'animal restent sans résultats concluants chez l'homme (Fayer & Ellis, 1993a, 1993b).

Différentes drogues ont été testées mais seulement deux médicaments ont été reconnus comme les plus efficaces chez les patients immunocompétents et parfois même chez les patients immunodéprimés. Il s'agit de la Paramomycine et du Nitazoxanide. La Paramomycine, un antibiotique aminoglycosidé n'avait pas montré de meilleure efficacité que le placebo chez l'homme. La majorité de patients a eu des rechutes après une amélioration initiale de symptômes (Caccio & Pozio, 2006). Le Nitazoxanide, dérivé du nitrothiazole-salicylamide, est actif sur de nombreux parasites, protistes et helminthes (Anderson & Curran, 2007). Son efficacité pour le traitement de la cryptosporidiose chez les immunocompétents a été reconnue et aux Etats-Unis, elle constitue un traitement autorisé pour les cryptosporidioses diarrhéiques chez les enfants (White CA, NTZ 2004), alors que chez les patients VIH+ l'action dépend du degré d'immunosuppression et de la posologie et l'efficacité ne semble pas prouvée (Abubakar *et al.*, 2007). Testée chez

différents modèles animaux, son efficacité n'a pas été prouvée non plus (Ramirez *et al.*, 2004).

Chez les patients immunocompétents, l'infection par *Cryptosporidium* cause une maladie de type auto résolutive. Le plus souvent, l'utilisation de médicaments n'est pas indispensable à la guérison et le traitement symptomatique est généralement suffisant. L'état de déshydratation du patient devra être évalué pour compenser les pertes hydriques par une réhydratation orale ou parentérale (Ripert & Guyot, 2003). Chez l'hôte immunodéprimé, l'évaluation de la perte hydrique est très importante parce que la perte liquidienne due à la diarrhée sévère peut entraîner une fuite en liquides et en électrolytes beaucoup plus considérable (Ripert & Guyot, 2003). Les médicaments pourraient être un complément utile au traitement symptomatique, mais leur efficacité est très variable.

Toutefois, l'avènement de la multithérapie antirétrovirale (Highly active antiretroviral therapy-HAART) a eu un impact remarquable sur de nombreuses infections opportunistes, dont les parasitoses qui s'est traduit par une réduction nette de la prévalence des infections opportunistes. La thérapie HAART qui est basée sur une combinaison d'inhibiteurs à la fois nucléosidiques et non-nucléosidiques de la transcriptase reverse et d'inhibiteurs de protéases, cause une restauration immunitaire, qui se caractérise par une augmentation de nombre de lymphocytes CD4+. Chez les patients immunodéprimés, particulièrement par le VIH, le meilleur traitement de la cryptosporidiose ainsi que d'autres infections opportunistes consiste en la reconstitution immunitaire par HAART (Caccio & Pozio, 2006).

De plus, des études ont rapporté un rétablissement après une cryptosporidiose chez de patients VIH+/SIDA à la suite d'une thérapie HAART n'incluant que des inhibiteurs de protéases, sans augmentation associée du nombre des lymphocytes CD4+. Des rechutes n'ont pas été observées après six mois, même si les valeurs de CD4+ sont restées basses, et la charge virale élevée. En conclusion, ces études suggèrent que les inhibiteurs de protéases peuvent aussi avoir un effet pharmacologique direct sur le parasite (Pozio & Morales, 2005).

En fait, il semble pour le moment que la thérapie anti-rétrovirale soit une des meilleures alternatives pour le traitement de la cryptosporidiose. Toutefois, il faut considérer que la cryptosporidiose reste toujours un problème majeur pour le patient VIH+ résistant ou intolérant au traitement HAART, pour la plupart des personnes

infectées du SIDA dans les pays en développement sans accès au traitement HAART, et pour les enfants souffrant de malnutrition grave (Caccio & Pozio, 2006). De plus, cette thérapie n'est pas une option préconisée pour des patients atteints d'autres types d'immunodépression (Abubakar *et al.*, 2007).

6. PARASITES ET NEOPLASIE

6.1. PROTOZOAIRES

Des hypothèses diverses ont évoqué l'implication de *Trichomonas vaginalis* dans des cancers cervicaux, et de *Toxoplasma gondii* dans divers types de tumeurs parmi lesquelles les tumeurs oculaires, les méningiomes, les leucémies et les lymphomes (Khurana *et al.*, 2005). Cependant, c'est seulement à propos du rôle transformant des *Theileria* spp, des Apicomplexa, que des évidences claires montrant leur rôle transformant ont été apportées. Nous considérerons, donc dans ce chapitre, seulement les cas de *Theileria* et introduirons la nouvelle problématique configurée par *Cryptosporidium*.

6.1.1. Le cas de *Theileria* spp.

La modulation de l'apoptose a émergé comme une arme importante dans l'arsenal pathogène de certains protistes intracellulaires tels que *C. parvum*, *Leishmania* spp, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp et *Theileria* spp.. Habituellement, l'apoptose des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires fait partie des mécanismes de défense de l'hôte (Carmen & Sinai, 2007). Différents pathogènes viraux (Roulston *et al.*, 1999), bactériens (Gao & Kwaik, 2000) et protistes (Heussler *et al.*, 2001; Carmen & Sinai, 2007) ont développé des mécanismes pour envahir et se multiplier dans des cellules hôtes en inhibant l'apoptose.

Les parasites du genre *Theileria* sont des protozoaires intracellulaires appartenant au groupe des Apicomplexa. *Theileria annulata* et *Theileria parva* sont deux espèces particulièrement pathogènes pour le bovin. Elles provoquent une maladie lymphoproliférative souvent mortelle nommée respectivement theilériose et fièvre de la Côte Est qui affecte des millions d'animaux en Afrique et en Inde et qui est transmise par des tiques. *Theileria* sp. infecte et transforme les lymphocytes des bovins. Cette transformation est accompagnée d'une prolifération non contrôlée des cellules infectées

et de leur expansion clonale. Les cellules transformées peuvent aussi acquérir un phénotype métastatique qui leur permet d'envahir d'autres tissus de l'hôte (Dobbelaere *et al.*, 2000).

Les cellules transformées par l'infection par *T. parva* ont beaucoup de caractéristiques communes avec celles des cellules tumorales: la prolifération illimitée *in vitro*, l'expansion clonale, la formation de tumeurs invasives chez les souris Nude, et la production de lésions multicentriques faisant penser à un lymphosarcome (Irvin *et al.*, 1975; Morrison *et al.*, 1981). Un aspect unique de la transformation induite par *T. parva* est qu'elle est entièrement réversible. Quand le parasite est éliminé par traitement avec des drogues anti-*Theileria*, les cellules retournent à un phénotype de repos (Dobbelaere *et al.*, 1988).

Pour induire la transformation des cellules de l'hôte, le parasite interfère sur les voies de transduction du signal en induisant une inhibition de l'apoptose (Dobbelaere *et al.*, 2000; Dobbelaere & Rottenberg, 2003). Cette inhibition a été reliée à l'activation de NF- κ B (Ivanov *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1997; Heussler *et al.*, 1999), de c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) (c-Jun N terminal kinases) (Lizundia *et al.*, 2005) et de la protéine kinase A (PKA) (Guergnon *et al.*, 2006). L'activation NF- κ B est connue pour augmenter la transcription de gènes « pro-survival » comprenant c-FLIP, c-IAP et x-IAP. Ces gènes sont surexprimés dans les cellules infectées par *Theileria* (Kuenzi *et al.*, 2003).

De plus, l'infection par *Theileria* a comme conséquence l'activation du facteur de transcription AP-1 dépendant de JNK avec une augmentation de l'expression des membres de la famille *c-Jun* (Galley *et al.*, 1997; Botteron & Dobbelaere, 1998; Chaussepied *et al.*, 1998). Lizundia *et al.* ont constaté que l'inhibition de JNK par un mutant négatif dominant (Lizundia *et al.*, 2005) ou par un inhibiteur pharmacologique (Lizundia *et al.*, 2006) peut induire l'apoptose dans des lymphocytes B infectées par le parasite. Récemment, Dessauge *et al.* ont décrit que dans des lymphocytes B infectées par *T. parva*, l'un des mécanismes principaux impliqués dans l'activation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 est lié à l'induction de c-Myc (Dessauge *et al.*, 2005). De plus, le même groupe de chercheurs a suggéré que d'autres réponses anti-apoptotiques associées à NF- κ B et JNK étaient médiées par l'induction de c-Myc.

6.1.2. *Cryptosporidium* et néoplasie

Chez l'homme, on a pu corréler la survenue de certains cancers associés à la présence de parasites. Particulièrement, pour *Cryptosporidium*, un cas d'adénocarcinome du colon a été diagnostiqué sur une biopsie chez un patient de 64 ans chez lequel on a retrouvé des oocystes de *Cryptosporidium* (Izquierdo *et al.*, 1988). Plus récemment, une prévalence de 18% de parasitisme par *Cryptosporidium* a été rapportée chez des patients atteints de cancer colorectal en Europe (Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007). Par ailleurs, *Cryptosporidium* serait capable d'induire la formation de polypes auriculo-pharyngés chez l'iguane (*Iguana iguana*) (Uhl *et al.*, 2001).

6.2. LES TREMATODES

Parmi les parasites, le trématode *Schistosoma haematobium* a été incriminé dans la survenue du cancer de la vessie chez l'homme (Mayer & Fried, 2007). L'« *International Agency for Research in Cancer* » a reconnu *S. haematobium* comme une cause directe potentielle de ce type de cancer. Plusieurs mécanismes ont été suggérés: (1) La fibrose induite par les œufs de schistosomes peut induire une prolifération cellulaire, une hyperplasie et un processus de métaplasie, qui sont des modifications considérées comme précancéreuses (Rosin *et al.*, 1994); (2) Les nitrosamines produites par les bactéries des urines lors de bilharzioses chroniques pourraient être cancérigène (Hicks *et al.*, 1982). La stase urinaire permet la concentration de carcinogènes endogènes menant à leur absorption à partir de l'urine et à l'exposition de l'épithélium de la vessie à ces produits (Bhagwandeem, 1976; Cheever, 1978).

Le lien entre *S. mansoni* et cancer du foie semble être indirect. Les patients présentant une bilharziose à *S. mansoni* ont des taux plus élevés d'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite C (VHC) (deux virus associés au phénomène de cancérogenèse) comparé à ceux des patients non parasités (Lyra *et al.*, 1976; Halim *et al.*, 1999). Le taux plus élevé de VHB et de VHC chez les patients atteints d'une schistosomiasis pourrait s'expliquer, en partie, par la transmission de ces virus pendant les transfusions nécessaires pour compenser les pertes sanguines dues à l'hématémèse (complication relativement fréquente des schistosomoses hépatospléniques) par la contamination du sang ou des aiguilles et seringues (Madwar *et al.*, 1989; Darwish *et al.*, 1993). Le rôle de *S. japonicum* dans des phénomènes de cancérogenèse est moins accepté, bien que cette espèce ait déjà été associée à des cancers

du foie ou colorectaux (Khurana *et al.*, 2005). Les études épidémiologiques et cliniques en Chine et au Japon suggèrent un rôle probable de *S. japonicum* en tant que facteur de risque de carcinome hépatocellulaire. Les études expérimentales ont prouvé qu'un cancer du foie induit par des carcinogènes connus se développera plus précocement chez les animaux infectés avec *S. japonicum* (Khurana *et al.*, 2005).

Les trématodes Opisthorchiidae, qui mesurent en général moins de 20 mm de longueur et moins de 5 mm de largeur, parviennent à maturité sexuelle dans les canaux biliaires de mammifères domestiques et sauvages et aussi chez l'homme, chez qui les adultes libèrent leurs œufs embryonnés (Dei-Cas & Verrez-Bagni, sous presse). Véhiculés par la bile, les œufs gagnent l'intestin et se retrouvent dans les fèces. *Clonorchis sinensis* ("douve de Chine"), *Opisthorchis viverrini*, et *O. felinus* ("douve du foie du chat") sont les espèces les plus incriminées. Les vers s'installent dans les canaux biliaires de petit ou moyen diamètre où ils demeurent attachés par leurs ventouses à l'épithélium. Celui-ci s'entoure d'un infiltrat cellulaire discret souvent riche en éosinophiles et plasmocytes. La production locale de mucus augmente. Lors d'infections moyennes et sévères (plus de 1000 vers), desquamation et prolifération de l'épithélium biliaire s'entremêlent, provoquant à la longue de véritables cholangiectasies et une cholangiogenèse (Vernes & Dei-Cas, 1978). Sur ces lésions développerait le cholangiocarcinome. La longévité de ces parasites est importante, variant de 8 à plus de 20 ans.

De nombreuses études font état de 35 millions de personnes infectées par *C. sinensis* dont 15 millions en Chine (Lun *et al.*, 2005). La prévalence des opisthorchidoses augmenterait actuellement du fait de l'augmentation de la consommation de poissons crus. Or, les trématodes *Clonorchis* et *Opisthorchis* seraient la cause d'une proportion importante de cas de cholangiocarcinome (Rim, 2005; Parkin, 2006). Les parasitoses induites par les espèces *O. viverrini*, *O. felinus* et *C. sinensis*, constituent un problème important de santé publique dans des vastes zones d'endémie. Dans ces régions, ces parasites seraient les principaux agents étiologiques de cholangiocarcinome (carcinome peu fréquent dans des zones sans opisthorchiidose), ce cancer est une des principales causes de mortalité en Thaïlande (Khurana *et al.*, 2005). De nombreux cas de cancer du foie ont été rapportés dans ce pays chez des patients infectés par *O. viverrini*. L'IARC (*International agency for research on cancer*) a conclu définitivement que *O. viverrini*

était un agent carcinogène pour l'homme, tandis que le rôle cancérigène d'*O. felineus* et de *C. sinensis* seraient moins importante (Khurana *et al.*, 2005). Cependant, des cas de cancer du foie chez des patients infectés par *C. sinensis* ont été aussi rapportés en Chine, Hong Kong, Corée et Japon et aussi chez des émigrants provenant de ces pays installés en Amérique du Nord (Khurana *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, la dégénérescence maligne associée aux opisthorchidoses hépatobiliaires, qui assombrit le pronostic de ces trématodoses, constitue l'association la plus importante d'une parasitose due à un pathogène eucaryote avec une lésion cancéreuse chez l'homme.

Le mécanisme du processus néoplasique conduisant au cholangiocarcinome demeure inconnu. Il pourrait être multiple (Fig. 2):

1. D'une part, des composés azotés, notamment des nitrosamines, pourraient jouer un rôle. Ces composés, soit d'origine exogène car abondants dans des aliments fermentés consommés abondamment dans les zones endémiques (par exemple, "pla-ra"), tels que l'oxyde nitrique (NO) produit par les effecteurs cellulaires lors de l'inflammation chronique péricanaliculaire causée par les parasites (Sripa *et al.*, 2007). les radicaux oxydants libérés contribueraient à la transformation néoplasique de l'épithélium biliaire en altérant l'ADN et en induisant des mutations (Khurana *et al.*, 2005).
2. D'autre part, des observations récentes suggèrent qu'*O. viverrini* sécrète des protéines mitogènes dans les tissus de l'hôte. Des produits solubles excrétés/sécrétés par ce ver induisent *in vitro* la prolifération cellulaire (Sripa *et al.*, 2007). De même, des séquences codant pour des protéines jouant un rôle dans des processus de cancérogenèse (telles que la progranuline, un médiateur du cycle cellulaire, la kallikreine-like serine protéase, associée au cancer de la prostate quand elle est surexprimée, la phospholipase A2 impliquée dans la production de la cyclo-oxygénase 2) ont été identifiées dans le génome d'*O. viverrini* (Laha *et al.*, 2007).

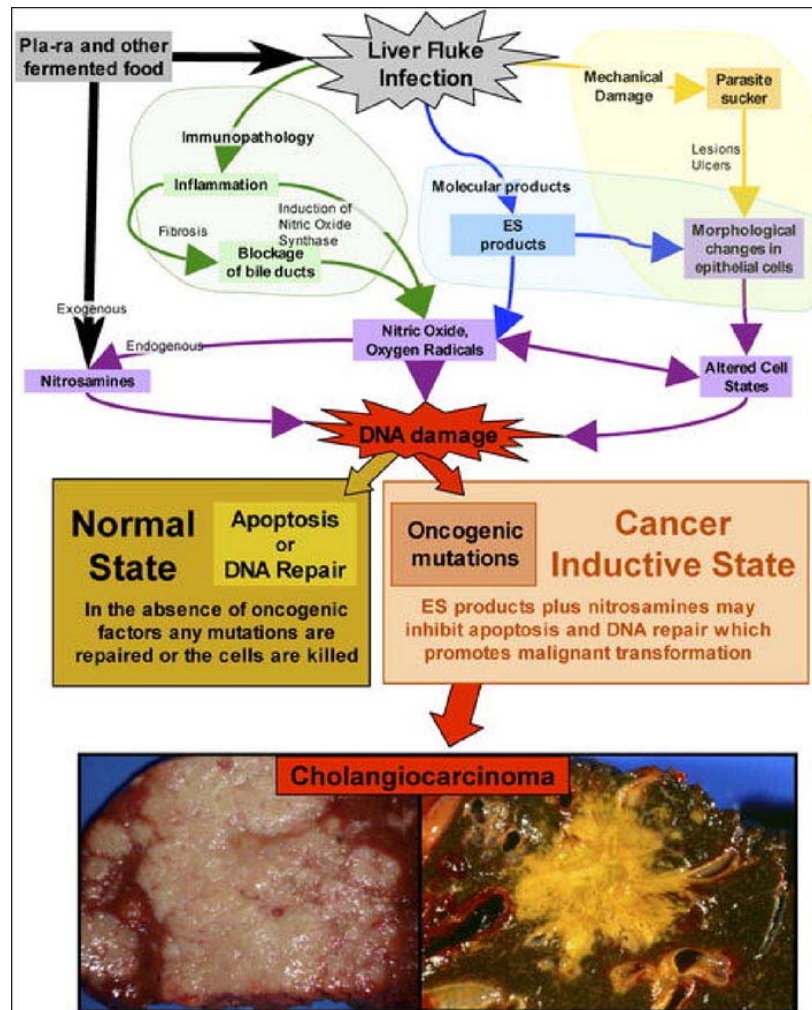


Figure N° 2. Mécanismes incriminés dans le développement de cholangiocarcinome.
D'après Sripa et al., 2007.

7. DES MEILLEURS OUTILS POUR LES RECHERCHES SUR LA CRYPTOSPORIDIOSE SONT NECESSAIRES

Certains outils généralement utilisés pour étudier d'autres pathogènes que *Cryptosporidium* ne peuvent l'être pour l'étude de ce parasite. L'incapacité de cryopréserver les oocystes du parasite et l'absence de culture *in vitro* continue sont probablement les limitations les plus sérieuses. Notamment, malgré les résultats prometteurs de certaines études, il n'existe aucune méthode validée pour la cryopréservation des oocystes ou des sporozoïtes des *Cryptosporidium* spp. Une grande variété de conditions a été testée sans succès comprenant l'utilisation de diméthyl sulfoxyde, glycérol, et aussi l'utilisation d'une matrice extracellulaire

(hydroxyéthylamidon) qui s'est révélée utile pour la cryopréservation des *Plasmodium* spp.. Les tentatives de cryopréservation de cellules infectées provenant de cultures ont également échoué (Arrowood, 2002). En conséquence, l'accès aux étapes endogènes du cycle biologique du parasite est limité, l'entretien de souches *in vitro* bien caractérisées n'est pas possible, et le développement des études comparatives entre les multiples isolats de *Cryptosporidium* est limité (Tzipori & Widmer, 2008). Enfin, un dernier problème engendré par l'absence de système de culture en continu, est l'impossibilité de produire au laboratoire des quantités importantes d'oocystes.

7.1. LA CULTURE *IN VITRO*

En 1983, une équipe de recherche réalise pour la première fois la reproduction du cycle des cryptosporidies sur des cellules endodermiques de membrane chorio-allantoïde d'embryons de poule. Les stades parasitaires se développent à la surface des cellules endodermiques de la membrane chorio-allantoïdienne (Current & Long, 1983). Le cycle a également été reproduit avec succès dans une large variété de lignées cellulaires.

La réussite du développement des cryptosporidies sur cette grande variété de cellules indique l'absence de spécificité pour un support cellulaire; ce qui concorde avec des localisations variées autres qu'intestinales, du parasite. Cependant, les cellules épithéliales intestinales paraissent les plus adaptées à la culture *in vitro*. Parmi elles, on peut citer les lignées cellulaires Caco 2 (cellules épithéliales humaines), HT29.74 (cellules humaines de carcinome du colon), HRT (cellules humaine de tumeur rectale), T84 (cellules humaines de carcinome du colon) et HCT-8 (adénocarcinome iléo-caecal humain) (Arrowood, 2002).

Le succès de la propagation de *C. parvum* en culture axénique a été récemment rapporté par l'équipe d'Hijjawi (Hijjawi *et al.*, 2004). Pour déterminer si ce phénomène pouvait être élargi à d'autres isolats de *C. parvum*, d'autres chercheurs ont tenté de cultiver le parasite dans des cultures axéniques en utilisant les mêmes conditions. Les données de ces dernières études ont montré que les oocystes n'ont pas complété leur cycle biologique pour produire de nouveaux oocystes viables et infectieux. En conclusion, il semble que l'obtention du développement de *Cryptosporidium* en culture axénique ne soit pas un phénomène universel ou facilement réalisable (Girouard *et al.*, 2006). D'une autre part, la plus longue durée de vie de *Cryptosporidium* en culture est de 25 jours (Hijjawi *et al.*, 2001).

Une étude plus récente de l'équipe de Hijjawi a révélé que des différents stades évolutifs extra cellulaires de *C. parvum* développés en culture axénique pouvaient être visualisés par immuno-marquage en utilisant des anticorps anti-sporozoïte et anti-paroi de l'oocyste (Sporo-Glotrade mark et Crypto Cel) (Boxell *et al.*, 2008).

La culture *in vitro* de *Cryptosporidium* spp. fournit un outil intéressant pour l'étude de la biologie du pathogène, ou l'évaluation de traitements antiparasitaire. Elle reste toutefois d'un intérêt limité pour la multiplication du parasite, tant en raison des faibles rendements obtenus en raison de l'impossibilité de culture continue.

7.2. MODELES ANIMAUX

Le modèle animal se présente donc comme un moyen complémentaire pour l'étude de l'infection par *Cryptosporidium* spp. et pour leur propagation à long terme. La difficulté majeure de cet outil est liée à la relative spécificité d'hôte de certaines espèces et de certains génotypes de *Cryptosporidium*. *C. parvum* est l'espèce la plus communément utilisée dans les laboratoires car il s'agit de l'espèce la plus répandue chez les mammifères et qui joue un rôle prédominant dans l'infection humaine. Même en se limitant dans un premier temps aux espèces reconnues comme pathogènes pour l'homme, on ne dispose pas actuellement de modèle standard d'étude.

7.2.1. Modèle souris

Le modèle murin est le plus communément utilisé pour des raisons pratiques de coût, de maintenance et d'entretien. Deux types de modèles se distinguent selon le statut immunitaire de l'animal. Les souris peuvent être immunocompétentes ou immunodéprimées.

La souris immunocompétente :

1. *La souris nouveau-née:* La sensibilité des souris immunocompétentes à l'infection par *C. parvum* se limite, pour beaucoup de lignées, au stade néonatal. Ainsi, Sherwood *et al.* ont montré sur huit lignées de souris immunocompétentes que ces animaux développaient une infection quand des parasites de *C. parvum* leur étaient administrés avant l'âge de quatre jours. À l'âge de 21 jours, la sensibilité à l'infection est limitée et elle n'est pas augmentée par l'injection de cyclophosphamide (Sherwood *et al.*, 1982). Novak *et al.* ont confirmé ces observations en rapportant que les

souris BALB/c étaient sensibles à *C. parvum* jusqu'à l'âge de 14 jours (Novak & Sterling, 1991). De plus, la quantité de parasites retrouvés dans l'intestin est inversement corrélée à l'âge de l'animal (Vitovec & Koudela, 1988). Le modèle souris « multimamate » (*Mastomys coucha*) nouvelle-née permet d'obtenir une infection au laboratoire par *C. andersoni* (Kvac *et al.*, 2007b).

2. *La souris adulte*: Les souris adultes BALB/c et CD1 sont rarement susceptibles à l'infection par *Cryptosporidium* mais les adultes axéniques (germ free) des mêmes lignées sont fortement susceptibles à l'infection. Toutefois, l'infection obtenue chez ces souris « germ free » reste limitée par comparaison aux modèles néonataux, réduisant ainsi considérablement l'intérêt de ce modèle (Harp *et al.*, 1988). Récemment, des oocystes de *C. parvum* ont été prétraités avec de l'hypochlorite de sodium ou de l'eau acidifiée puis inoculés par sonde gastrique chez des souris C57BL6 adultes immunocompétentes. Des manifestations telles que perte de poids et changements physiologiques au niveau intestinal ont été retrouvées, en réponse à l'infection par *C. parvum* traité avec de l'eau acidifiée (Garza *et al.*, 2008).

La souris immunodéprimée :

1. *Immunodépression artificielle* : Différentes techniques peuvent être utilisées pour immunodéprimer des souris. Les plus communes utilisent l'administration d'anticorps monoclonaux anti-CD4, anti-CD8, anti-IL2 et anti-IFN, seuls ou en association (Ungar *et al.*, 1991). ou des corticoïdes. Des souris BALB/c non sevrées traitées avec des anticorps anti-CD4 associés ou non à des anti-CD8 développent une cryptosporidiose chronique à *C. parvum*. À l'arrêt de l'administration des anticorps, les souris éliminent l'infection et aucune trace du parasite n'est retrouvée à la nécropsie (Ungar *et al.*, 1990). Chez les souris BALB/c adultes, la déplétion des lymphocytes T CD4+, associée ou non à celle des lymphocytes T CD8+, permet également d'établir une infection qui se maintient tant que les souris reçoivent le traitement (Ungar *et al.*, 1991). Chez les souris traitées avec des anticorps anti-IFN gamma, la

cryptosporidiose induite expérimentalement se traduit par une excrétion d'oocystes plus importante, mais qui reste spontanément résolutive (Ungar *et al.*, 1991). Dans le cas d'administration de corticoïdes, l'efficacité dépend de différents facteurs :

- a. Fond génétique du modèle animal : Rasmussen *et al.* ont révélé, en évaluant quatre lignées différentes, une meilleure sensibilité à l'infection des souris C57BL/6 traitées par la dexaméthasone (Rasmussen & Healey, 1992c).
- b. Mode d'administration de la drogue : Sur ce plan il existe des divergences selon les auteurs. Yang *et al.* ont rapporté une plus grande efficacité de l'administration par voie orale (Yang & Healey, 1993), tandis que Rasmussen *et al.* ont obtenu de meilleurs résultats avec l'injection intra-péritonéale (Rasmussen & Healey, 1992c). Ainsi, l'inoculation avec *C. parvum* de souris C57BL/6 traitées par injection intra-péritonéale de dexaméthasone permet d'obtenir une infection persistante durant toute la durée du traitement (Rasmussen & Healey, 1992c; Johansen & Sterling, 1994; Petry *et al.*, 1995). Mais en général il semble que pour de longues expériences, l'administration par voie orale a l'avantage d'être plus facile à administrer avec moins d'effets secondaires. Pendant de nombreuses années, divers régimes et modes d'administration de corticostéroïdes ont été mis au point dans notre laboratoire sur des animaux de laboratoire conventionnels ou génétiquement immunodéprimés (Soulez *et al.*, 1988; Aliouat *et al.*, 1995; Aliouat *et al.*, 1997; Dei-Cas *et al.*, 1998) . L'administration de dexaméthasone dans l'eau de boisson s'est révélée être la stratégie la plus efficace pour entretenir l'immunosuppression d'animaux hébergés en isolateurs de manière permanente.
- c. Type de drogue utilisée : l'immunodépression par la dexaméthasone est la plus communément utilisée mais une immunosuppression a aussi été obtenue par administration

d'acétate de methylprednisolone injectée par voie sous-cutanée (Miller & Schaefer, 2006).

2. *Immunodépression génétique* : Différents types de souris génétiquement immunodéprimées ont été testés. Parmi eux, il existe des modèles avec une susceptibilité plus élevée à l'infection. Heine *et al.*, 1984 ont trouvé dans la souris nude un modèle intéressant pour l'entretien de souches du parasite au laboratoire. Après inoculation orale, la période pré-patente est de 3 à 5 jours et l'élimination d'oocystes peut continuer jusqu'à 50 jours post-infection (Heine *et al.*, 1984). Une déficience en CMH de type II peut également favoriser une augmentation du nombre de parasites dans les tissus et la persistance de l'infection (Aguirre *et al.*, 1994). Plusieurs groupes de chercheurs ont testé les souris SCID, c'est-à-dire ayant un défaut en lymphocytes T et B. Chez des souris adultes SCID, il a été possible de développer une infection chronique par *C. parvum* et l'efficacité de ce modèle est prouvée pour des inoculum parasitaires compris entre 10^3 et 10^7 oocystes (Mead *et al.*, 1994). Différents auteurs ont décrit aussi la possibilité d'infection hépatique (Mead *et al.*, 1991; Harp *et al.*, 1992; Kuhls *et al.*, 1994; Mead *et al.*, 1994).

7.2.2. D'autres modèles animaux

Le modèle **rat immunodéprimé**, artificiellement ou génétiquement, fournit un modèle d'étude souvent utilisé pour étudier l'effet d'agents thérapeutiques (Fayer & Lindsay, 1997). Le modèle **hamster** est sensible à *C. parvum* (Rossi *et al.*, 1990; Rasmussen & Healey, 1992b), avec une sensibilité plus élevée chez les animaux âgés (20-24 mois) que chez les plus jeunes (8-12 semaines) (Rasmussen & Healey, 1992b). Ce modèle a permis de mettre en évidence un rôle potentiellement prophylactique de la déhydroépiandrostérone (DHEA) (Rasmussen & Healey, 1992a). Ce modèle est également sensible à *C. muris*, les animaux les plus jeunes (1 semaine) présentant une excrétion plus importante que des animaux plus âgés (5-10 semaines) (Rhee *et al.*, 1999). Rossi *et al.* ont présenté un modèle hamster immunodéprimé par injection d'hydroacétate de cortisone comme un modèle efficace de propagation de *Cryptosporidium* sp. (Rossi *et al.*, 1990). Ce modèle ne semble pas avoir été utilisé dans cette visée depuis. Des **gerbilles de Mongolie** (*Meriones unguiculatus*) adultes (âgées de huit semaines) ont été

sensibles à l'infection par des oocystes de *C. muris* isolés chez le bétail (Koudela *et al.*, 1998). Des gerbilles de Mongolie adultes plus jeunes (âgée d'un mois), et immunodéprimées par injection de dexaméthasone, ont développé une infection après l'inoculation d'oocystes de *C. hominis* ou de *C. parvum*. La dose infectieuse minimale était de 100 oocystes pour les deux espèces parasites (Baishanbo *et al.*, 2005). Les gerbilles infectées n'ont pas manifesté de symptômes cliniques. Ce modèle « gerbille de Mongolie traitée à la dexaméthasone » a permis d'évaluer l'efficacité de médicaments contre l'infection par *C. parvum* (Baishanbo *et al.*, 2006). Des gerbilles de Mongolie ont également développé une cryptosporidiose à la suite de l'inoculation d'oocystes de *C. andersoni* (Kvac *et al.*, 2007a). Le modèle **porcelet** permet d'obtenir une cryptosporidiose symptomatique, avec l'apparition de diarrhée chez les animaux infectés. Ce modèle présente l'avantage d'être sensible à *C. hominis*. Le porcelet constitue un bon modèle de propagation des isolats, mais nécessite des installations appropriées (Widmer *et al.*, 2000).

La comparaison en fonction des modèles animaux de cryptosporidiose est résumée dans le tableau N° 4 ci-après.

Tableau N° 4. Comparaison des différents modèles animaux de cryptosporidiose

Modèle	Utilisation	Avantages	Désavantages
Souris nouveau nées immuno-compétentes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Exploration de divers aspects de la biologie de <i>C. parvum</i>, incluant le développement parasitaire (Current & Reese, 1986; Upton & Gillock, 1996), et l'effet d'une infection simultanée avec d'autres pathogènes, tels que <i>Campylobacter jejuni</i> (Vitovec <i>et al.</i>, 1991). 2. Le model a également permis d'évaluer l'efficacité de méthodes de neutralisation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> (Ortega & Liao, 2006) 3. Evaluation de l'efficacité de drogue antiparasitaire (Fayer & Lindsay, 1997) 	La sensibilité des souris immunocompétentes à l'infection par <i>C. parvum</i> se limite, pour beaucoup de lignées, au moment du stade néonatal (Fayer & Lindsay, 1997)	<ol style="list-style-type: none"> 1. L'utilisation de ce modèle est limitée car il est difficile de manipuler des souriceaux nouveau-nés, dont la taille est comparable à celle d'un pouce humain. 2. De plus, l'infection, lorsqu'elle est obtenue, est transitoire. 3. En effet, les souris deviennent capables d'éliminer l'infection à partir de l'âge de deux à trois semaines, même en l'absence de traitement (Fayer & Lindsay, 1997)
Souris adultes immuno-compétentes	Exploration de la susceptibilité de la souris à l'infection	Manipulation plus facile	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enriquez et Sterling ont testé 19 lignées de souris pour conclure que seule la lignée C57BL/6J-bgJ, déficiente en cellules Natural Killer (NK), excrétaient des quantités significatives d'oocystes, qui restaient toutefois bien en deçà des résultats obtenus chez des souris néonatales (Enriquez & Sterling, 1991). 2. Les manifestations cliniques induites par <i>Cryptosporidium</i>, y compris la perte de poids et la diarrhée ne sont pas notées chez la souris adulte (Harp <i>et al.</i>, 1992)

<p>Souris immuno-déprimées artificiellement</p>	<p>Le modèle C57BL/6 immunodéprimé par administration de dexaméthasone a permis :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. D'étudier la réponse immunitaire à l'infection. 2. De mesurer l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> (Yang <i>et al.</i>, 1996). 3. D'évaluer des substances anti-<i>Cryptosporidium</i> (Healey <i>et al.</i>, 1995; Rasmussen <i>et al.</i>, 1995; Adjei <i>et al.</i>, 1999). 	<p>L'administration de la dexaméthasone dans l'eau de boissons fait que le traitement par voie orale soit plus facile d'application et en moins de temps (Yang & Healey, 1993)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Excrétion d'oocystes pendant le traitement 2. Dans le cas d'injection intrapéritoneal ou subcutanée il y a un effet traumatique pour les animaux, surtout pendant les expérimentations longues.
<p>Souris immuno-déprimées génétiquement</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Etudier la réponse immunitaire à l'infection. 2. Mesurer l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> 3. Explorer des pistes thérapeutiques (Fayer & Lindsay, 1997) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Une infection durable potentiellement létal peut être obtenue chez les souris athymiques nude de moins de 6 jours (Heine <i>et al.</i>, 1984). 2. Les souris SCID adultes développent facilement une infection chronique en réponse à <i>C. parvum</i> (Mead <i>et al.</i>, 1994) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. En général l'utilisation de modèles des souris nouveau-nées est limitée car il est difficile de manipuler des souriceaux. 2. Dans quelque cas, chez leur équivalentes adultes l'infection est modérée, sans signes cliniques ou histologiques (Fayer & Lindsay, 1997)
<p>Porc</p>	<p>Evaluation de l'infection par <i>C. parvum</i> et <i>hominis</i> (Vitovec & Koudela, 1992; Pereira <i>et al.</i>, 2002).</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Le modèle porcelet permet d'obtenir une cryptosporidiose symptomatique, avec l'apparition de diarrhée chez les animaux infectés par <i>C. parvum</i> (Vitovec & Koudela, 1992). 2. Ce modèle est sensible à <i>C. hominis</i> (Pereira <i>et al.</i>, 2002) 	<p>Nécessite pour sa maintenance des installations spéciales.</p>

Gerbilles sous immuno-dépression	<ol style="list-style-type: none"> 1. Evaluation de l'infection par <i>C. hominis</i>, <i>C. andersoni</i> 2. Evaluation de drogues (Baishanbo <i>et al.</i>, 2006) 	Sensibilité à <i>C. parvum</i> et à <i>C. hominis</i> (Baishanbo <i>et al.</i> , 2005)	La cryptosporidiose est asymptomatique et donc l'étude des manifestations cliniques n'est pas possible
Rats immuno-deprimés artificiellement	Efficacité de drogue antiparasitaire. (Fayer & Lindsay, 1997).	Le modèle permet l'étude de la cryptosporidiose pulmonaire (Fayer & Lindsay, 1997).	Il y a un taux de mortalité élevé à cause de traitement immunosupresseur (Fayer & Lindsay, 1997)

IV. OBJECTIFS ET STRATEGIES

1. OBJECTIFS

L'objectif général de ce travail est de fournir les bases cognitives nécessaires au développement de moyens rationnels de prévention et de contrôle de la cryptosporidiose.

Les objectifs spécifiques sont les suivants:

1. Identification des espèces et sous espèces de *Cryptosporidium* parasitant des hôtes provenant de différentes régions.
2. Caractérisation de populations naturelles de *Cryptosporidium* spp en termes de pouvoir pathogène, modalité de transmission, nosogéographie, et autres facteurs à impact épidémiologique.
3. Évaluation des caractères phénotypiques de parasites.

2. STRATEGIES D'APPROCHE

La stratégie méthodologique retenue s'appuie:

1. D'une part, sur une approche moléculaire uni- et multilocus de l'identification des espèces et génotypes de *Cryptosporidium*;
2. D'autre part, afin d'estimer l'impact sanitaire des populations parasitaires identifiées en termes de pathogénicité et de transmissibilité, il s'avérait nécessaire de les caractériser sur le plan phénotypique. Il a fallu donc développer un modèle expérimental reproductible permettant de comparer les différences phénotypiques entre espèces et/ou génotypes de *Cryptosporidium*.

Pour ces raisons, ce travail de thèse se déroule selon les axes suivants :

1. Le premier axe tente d'identifier les taxons de *Cryptosporidium* représentés dans des isolats provenant de France, Haïti, Venezuela et Iran, et de définir la structure génétique des populations parasitaires ciblées.
2. Le second axe propose la mise au point d'un nouveau modèle murin pour l'étude comparative de l'infection par des espèces de *Cryptosporidium*.

3. Le troisième axe, émergeant de façon inattendue, tente de caractériser la néoplasie gastro-intestinale, découverte au cours de ce travail, induite par *C. parvum* chez la souris SCID, et explore la capacité d'autres espèces du genre d'induire ce type de lésions.

V. MATERIELS ET METHODES

1. RECHERCHES EPIDEMIOLOGIQUES

1.1. COLLECTE DES ECHANTILLONS

La variabilité génétique des espèces et sous espèces de *Cryptosporidium* dans différentes régions a été étudiée : Venezuela, France, Haïti et Iran. Les régions ont été choisies en tenant compte des collaborations que mon laboratoire d'accueil (EA3609 - ECOPA) a établi avec d'autres institutions.

Venezuela: Au Venezuela, la collaboration avec des différents services de Parasitologie a été facilitée grâce à mon lien avec ce pays, puisque mon travail a été réalisé dans le cadre d'une bourse à la mobilité de « l'Universidad Central de Venezuela » me permettant de quitter temporairement mon service d'affectation (le Parasitologie de l'Ecole de Médecine « Jose Maria Vargas », Venezuela) pour venir en France.

Dans la première étude, des collectes de fèces de 397 patients infectés par VIH ont été réalisées. Chaque patient a fourni 3 échantillons fécaux pour la réalisation des analyses coproparasitaires: examen microscopique direct, test de Kato, technique de Baermann et coloration de Zielh-Neelsen modifiée. Un questionnaire a été adressé à chaque patient concernant l'âge, le sexe, le statut immunitaire, son mode de vie (rural, urbain), son taux de lymphocytes T CD4+, ses contacts avec des animaux domestiques, son type d'eau de boisson (potable, non potable), la présence de symptômes, etc. Des informations sur des épisodes antérieurs de cryptosporidiose ont aussi été recueillies.

Dans la deuxième étude au Venezuela la récolte d'échantillons de patients vénézuéliens a été effectuée dans les centres suivants: le Laboratoire des Parasitoses Intestinales du service de Parasitologie de l'École de Médecine « José María Vargas » de l'Universidad Central de Venezuela (U.C.V.), le Laboratoire de Géohelminthiases de l'Institut de Médecine Tropicale de l'U.C.V., le Laboratoire de Parasitologie de l'École de Bioanalyses de l'U.C.V.. Les échantillons ont été collectés dans des conditions adéquates pour permettre leur stockage de manière

prolongée. On a aussi inclus des échantillons d'enfants provenant de l'Hôpital pédiatrique "J.M. de los Ríos" hospitalisés par différentes causes, avec le but d'établir un profil de risque pour l'infection par *Cryptosporidium* dans ce groupe.

D'autre part, on a reçu 96 échantillons d'origine animale récoltés dans différentes propriétés des états Bolivar et Apure. Les échantillons ont été périodiquement récoltés ensuite dans les différents centres et préparés pour leur envoi en France une fois obtenus tous les permis nécessaires pour leur exportation.

France et Haïti : Les isolats humains français ont été collectés par l'intermédiaire d'un réseau de centres hospitalo-universitaires. Les isolats humains haïtiens ont été recueillis dans le cadre d'un projet VIHPAL, développé à Port-au-Prince (Haïti). La plupart des isolats animaux ont été fournis par le Dr Chartier (AFSSA, Laboratoire d'étude et recherche caprines, Niort, France). Cent dix-sept prélèvements fécaux d'origine humaine ou animale dans lesquels des oocystes de *Cryptosporidium* ont été détectés par examen microscopique dans des laboratoires indépendants du nôtre ont été analysés dans notre étude.

Iran: La collaboration avec l'Iran a été facilitée par la présence dans notre groupe de Mr. Ahmad Meamar, étudiant du département de Parasitologie et Mycologie de l'Université de Téhéran venu travailler au sein de l'EA3609 dans le cadre son doctorat.

Quinze prélèvements humains (8 patients infectés par VIH et 7 enfants) et neuf d'origine animale (7 vaches et 2 dindes) ont été collectés en Iran.

Dans tous les cas, les échantillons ont été préservés dans du bichromate de potassium à 2.5% dans l'eau à 4°C, afin de préserver la viabilité des oocystes.

1.2. DETECTION MICROSCOPIQUE PAR LA COLORATION DE ZIELH-NEELSEN MODIFIEE.

Après fixation au méthanol pendant 5 min, les lames des frottis fécaux sont séchées à l'air libre puis plongées dans la fuchsine phéniquée de Zielh (Réactifs RAL, Paris, France) pendant 1h. Après rinçage à l'eau, une décoloration par l'acide sulfurique en solution à 2% est réalisée pendant 20 sec. Cette décoloration est suivie d'un nouveau rinçage à l'eau, puis les lames sont immergées dans une solution de vert de malachite

(Réactifs RAL, Paris, France) à 5% pendant 5 min pour une contre coloration. Après rinçage à l'eau et séchage à l'air, les lames sont montées à l'Eukitt (K, Kindler GmbH, Freiburg).

1.3. CONCENTRATION PAR IMMUNOSEPARATION MAGNETIQUE

Les oocystes sont purifiés et concentrés par séparation immuno-magnétique (IMS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) selon le protocole du fabricant. Le culot parasite est repris avec de l'eau jusqu'à compléter un volume de 10 ml, 1000 µl de tampon SL A et 1000 µl de tampon SL B ainsi que 100 µl de billes magnétiques sensibilisées avec des anticorps anti-*Cryptosporidium* sont ajoutés aux échantillons. Les échantillons sont placés sous agitation douce pendant une heure à température ambiante. Des aimants permettent ensuite de séparer les complexes billes-oocystes du reste de l'échantillon. Les oocystes sont ensuite détachés des billes magnétiques par coupure de liaison antigène-anticorps avec 50 µl d'acide chlorhydrique (HCL 0.1N pendant 5 min) et ensuite une neutralisation est faite par 5 µl de NAOH.

1.4. MARQUAGE IMMUNOFLUORESCENT

Les anticorps utilisés proviennent d'un kit de détection pour *Cryptosporidium*, FITC conjugate anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody (Cellabs Pty. Ltd, Croissy-Beaubourg, France) et sont utilisés selon les instructions du fabricant. Les oocystes sont fixés au puis 15 µl d'anticorps sont ajoutés et les lames sont incubées 1 h à 37°C en chambre humide. Cette incubation est suivie de 3 lavages en PBS. Après montage avec un mélange Mowiol-Dabco-Glycérol, les lames sont observées en microscopie à épifluorescence.

1.5. EXTRACTION D'ADN

Les échantillons sont repris en tampon STE (Tris 10mM, EDTA 0.1 mM, SDS 1%) Afin de rompre la paroi des oocystes, les échantillons sont soumis à 3 séries de chocs thermiques (3 min dans l'azote liquide suivi par 3 min à 56°C). Ensuite, une digestion protéique est réalisée en présence de 0.2 mg/ml de protéine K (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) pendant la nuit à 56°C. L'ADN est ensuite extrait par ajouts de phénol puis de chloroforme alcool isoamylique (24/1). Chaque extraction est suivi d'une centrifugation de 10 min à 14 000 g, puis le transfert de la phase supérieure aqueuse dans un nouveau tube stérile. L'ADN de la phase aqueuse est alors précipité en

présence d'1/10 de volume d'acétate de sodium 3M et d'un microlitre de glycogène (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) pour deux volumes d'éthanol absolu glacé, à -20°C pendant la nuit. Après centrifugation de 20 min à 14 000 g, le culot est lavé à l'éthanol 70° puis séché quelque minute sous vide. L'ADN est alors redissous dans l'eau, puis conservé à -20°C. L'ADN peut subir une purification complémentaire, sur résine (Wizard DNA Clean up, Promega) et un traitement complémentaire avec du polyvinylpyrrolidone (PVP) pour l'élimination d'inhibiteurs de la PCR.

1.6. PCR NICHEE

Pour l'étude génotypique des prélèvements fécaux, une PCR-RFLP ciblant l'ADNr 18S a permis la caractérisation au niveau de l'espèce de l'isolat parasitaire. L'ADN amplifié correspond à un fragment de 820 pb du gène codant pour la sous unité 18S de l'ARN ribosomal de *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 2001b). Les amorces utilisées dans ce travail sont :

Tableau N°5. Liste d'amorces utilisées pour la réalisation de la PCR nichée

Oligonucléotide	Utilisation	Séquence (5'3')	Tm
18SXIAOEXTF	primer PCR 1 (+)	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG	46.6
18SXIAOEXTR	primer PCR 1 (-)	CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA	50.1
18SXIAOINTF	primer PCR 2 (+)	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	49.7
18SXIAOINTR	primer PCR 2 (-)	AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A	50.8

Dans la première étape de PCR, le mélange réactionnel contient 5 µl de tampon de PCR 10X à une concentration finale de 1X, 8 µl de MgCl₂ à une concentration finale de 4 mM, 4 µl de dNTPs à une concentration finale de 200 µM, 0.5 µl de chaque amorce externe à une concentration finale de 0.1 µM, 0.25 µl de Taq polymérase Amplitaq Gold (1.25 unités), 10 µl d'ADN, tout pour un volume final de 50 µl. L'amplification d'ADN est menée sur un thermocycleur PTC 200 (MJ Research). Le programme comprend 10 min de dénaturation à 94°C, suivi de 40 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation de 45s à 94 °C, une phase d'hybridation de 45s à 55°C, et une période d'extension de 1 min à 72°C. Le programme se termine par une dernière étape d'extension de 5 min à 72°C.

Pour la seconde étape de PCR, le mélange réactionnel contient 5 µl de tampon de PCR 10X à une concentration finale de 1X, 10 µl de MgCl₂ à une concentration finale de 5 mM, 4 µl de dNTPs à une concentration finale de 200 µM, 0.5 µl de chaque amorce externe à une concentration finale de 0.1 µM, 0.25 µl de Taq polymérase Amplitaq Gold (1.25 unités), 2 µl d'ADN de la 1^{ère} PCR, tout pour un volume final de 50 µl. L'amplification d'ADN est faite suivant les mêmes cycles thermiques que la première PCR.

Une électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% en tampon TBE 1X (Quantum Biotechnologies) contenant 0.5 µg/ml de bromure d'ethidium sous voltage de 100-120 volts a été réalisée pour observer le fragment d'ADN amplifié.

1.7. PCR LAXER

L'ADN amplifié correspond à un fragment de 452 pb ou fragment Laxer (Laxer *et al.*, 1991). Les amorces utilisées dans ce travail sont :

Tableau N° 6. Liste d'amorces utilisées pour la réalisation de la PCR Laxer

Oligonucléotide	Séquence (5'3')	Tm
CPLAXERF	CCGAGTTTGATCCAAAAAGTTACGAA	52.1
CPLAXERR	TAGCTCCTCATATGCCTTATTGAGTA	52.1

Le mélange réactionnel contient 5 µl de tampon de PCR 10X à une concentration finale de 1X, 4 µl de MgCl₂ à une concentration finale de 2 mM, 4 µl de dNTPs à une concentration finale de 200 µM, 2.5 µl de chaque amorce à une concentration finale de 0.5 µM, 0.2 µl de Taq GoldStar polymérase (1 unité), 10 µl d'ADN, tout pour un volume final de 50 µl. L'amplification d'ADN est menée sur un thermocycleur PTC 200 (MJ Research). Le programme comprend 10 min de dénaturation à 94°C, suivi de 40 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation de 30s à 94 °C, une phase d'hybridation de 30s à 50°C, et une période d'extension de 30s à 72°C. Le programme se termine par une dernière étape d'extension de 5 min à 72°C.

Une électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% en tampon TBE 1X (Quantum Biotechnologies) contenant 0.5 µg/ml de bromure d'ethidium sous voltage de 100-120 volts a été réalisée pour observer le fragment d'ADN amplifié.

1.8. PURIFICATION DE PRODUITS AMPLIFIES

Les produits PCR d'intérêt sont purifiés par passage sur membrane filtrante en utilisant le protocole Microcon PCR (Amicon, Millipore, USA). La totalité de l'amplifiât à purifier est déposée dans le réservoir microcon muni de son tube collecteur. Ensuite 200 µl d'eau sont ajoutés. Après centrifugation de 5 min à 14 000 g, 200 µl d'eau sont rajoutés et la centrifugation est répétée dans les mêmes conditions. L'ADN restant sur la membrane est alors repris dans 22 µl d'eau. Le réservoir est retourné dans un nouveau tube collecteur et subit une centrifugation pendant 5 min à 1000 g afin de récupérer l'amplifiât.

1.9. ANALYSE DE RFLP

Une analyse RFLP a été faite pour la détermination de l'espèce et du génotype de *Cryptosporidium* à partir des produits PCR purifiés (Xiao *et al.*, 1999). Les enzymes de restriction *Ssp* I ou *Ase* I ont été utilisées. Le mélange réactionnel préparé sur un volume final de 20 µl contient pour *Ssp* I : 2 µl de Tampon 10 SX (NE buffer), 2 U de *Ssp* I (0,4 µl), 6 µl de amplifiât purifié, 11.6 µl d'eau, et pour *Ase* I : 2 µl de Tampon 10 SX (NE buffer), 3 U de *Ase* I (0,3 µl), 6 µl de amplifiât purifié, 11.7 µl d'eau. Ensuite il subit une incubation à 37°C. Une électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% en tampon TBE 1X (Quantum Biotechnologies) contenant 0.5 µg/ml de bromure d'ethidium sous voltage de 100-120 volts a été réalisée afin de visualiser les fragments.

1.10. SEQUENÇAGE

Le séquençage est réalisé à partir des produits PCR purifiés. La stratégie de marquage est celle de terminaison (Big Dye Terminator, AB Warrington, UK). Dans un microtube, le mélange réactionnel à préparer contient : 3 µl de big dye, 1.5 µl de tampon 5X, 2.4 µl d'amorces sens ou antisens selon le cas, à une concentration de 1 µM, 9.1 µl du produit PCR purifié. L'amplification d'ADN est menée sur un thermocycleur PTC 200 (MJ Research). Le programme comprend 25 cycles de 10 sec à 94°C, 5 sec à 50 °C et 4 min à 60°C. La purification des réactions de séquences ainsi que l'électrophorèse sont réalisées par Genoscreen à l'Institut Pasteur de Lille. Afin d'analyser l'ensemble des séquences connues de l'ADNr 18S de *Cryptosporidium* spp, la banque de données GeneBank a été consultée.

1.11. MICROSATELLITE

Un marqueur minisatellite, MS5 (motif nucléotidique répété de 24 mers), et trois marqueurs microsatellites, MS9, ML1 et ML2, (motifs répétés de six, trois et deux mers respectivement), ont été retenus (Aiello *et al.*, 1999; Caccio *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2000; Caccio *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002; Mallon *et al.*, 2003a; Mallon *et al.*, 2003b). Ces marqueurs sont amplifiables à la fois chez *C. parvum* et *C. hominis*.

Chaque isolat parasitaire a été génotypé à ces quatre loci en utilisant les amorces décrites dans la littérature, à l'exception de l'amorce reverse de MS5 (5'-GTATGCTGGGGAATATAGCCAAAG-3'). Pour chaque paire d'amorces, la plus courte était marquée avec la carboxyfluorescéine ou l'hexachlorofluorescéine. Les

réactions PCR ont été effectuées en plaque 48 puits dans un volume réactionnel final de 25µl, détaillé ci après : 1X de Tampon II (Perkin Elmer Applied Biosystems), 2mM de MgCl₂ (Perkin Elmer Applied Biosystems), 0,2mM de dNTP (Lithium salt, Eurogentec), 0,4µM d'amorce sens (Eurogentec), 0,4µM d'amorce antisens (Eurogentec), 0,75U d'AmpliTaq Gold® (Perkin Elmer Applied Biosystems), 5µl d'ADN.

L'amplification a été réalisée sur thermocycleur PTC 200™ (MJ Research). Le programme débute par un chauffage à 94°C pendant 10 min afin d'activer la polymérase à activité Hot Start. L'amplification se déroule en 40 cycles de dénaturation (94°C, 30s)- hybridation des amorces (55°C*, 30s)- élongation (72°C, 30s). La dernière étape est une élongation finale à 72°C pendant 45mn. En effet, l'Amplitaq Gold® catalyse l'addition finale d'un nucléotide (souvent une adénosine) à l'extrémité 3' des deux brins de l'ADN. Afin de maximiser la probabilité de cet ajout et donc d'uniformiser nos résultats d'amplification, nous avons en allongé le temps d'élongation finale.

L'identification des allèles a été réalisée par électrophorèse capillaire, hautement résolutive, sur un 3730XL ABI DNA Analyser (Applied Biosystems) et avec le logiciel Analyse GeneMapper 3.0. La combinaison des quatre allèles obtenus donne le génotype multiloci de chaque isolat.

1.11.1. Classification des Genotype multiloci (GML), variabilité et structure génétiques des populations

Cette partie a été réalisée en collaboration avec le Dr. Anne-Laure Bañuls (IRD de Montpellier, France).

1.11.1.1. Méthode phénétique : visualisation par dendrogramme

La construction des dendrogrammes a été réalisée avec le programme « Genetics Toolbox ». Les dendrogrammes sont construits à partir de la matrice des distances de Jaccard, par une méthode de classification hiérarchique ascendante, la méthode UPGMA (unweighted pairgroup method of arithmetic averages) (Sneath & Sokal, 1962).

1.11.1.2. Analyse de la variabilité génétique

Plusieurs indices permettent d'apprécier la variabilité génétique.

* 57°C dans le cas du marqueur MS5

Le taux de polymorphisme : c'est le pourcentage de loci polymorphes sur l'ensemble des loci étudiés. Les loci dont le polymorphisme repose sur des variantes très rares ne sont pas considérés comme polymorphes.

La diversité génétique moyenne : la diversité génétique représente la variété des gènes dans une espèce, variété, ou souche particulière. C'est la somme de l'information dans les gènes d'un organisme individuel.

La diversité génotypique : elle correspond au nombre de génotypes différents dans le groupe considéré sur le nombre total d'isolats dans ce même groupe.

1.11.1.3. Tests de génétique des populations

Cryptosporidium étant un pathogène haploïde, les analyses de génétique des populations doivent se baser sur les tests de recombinaison (Tibayrenc *et al.*, 1990; Tibayrenc, 1995a). Ces tests prennent comme hypothèse nulle une situation de panmixie et explorent plusieurs critères de clonalité : la sur-représentation de certains génotypes multiloci (tests d1 et d2), la sous-représentation de certains génotypes multilocus (test e), et l'association non aléatoire de certains loci génétiquement indépendants (test f). Le seuil de signification des tests a été fixé à 1% pour le test f et 5% pour les autres tests (d1, d2, et e).

Ces résultats, non redondants, fournissent des indications complémentaires sur différentes manifestations du déséquilibre de liaison, qui est indice important d'une population à structure génétique clonale.

2. MODELE ANIMAL

2.1. SOURIS

Les protocoles expérimentaux ont été réalisés sur des souris femelles de 6-8 semaines de la souche CB-17-SCID, issues de l'élevage de l'Institut Pasteur de Lille. Les animaux ont été maintenus en cages individuelles ou groupés au sein d'un isolateur et sous dépression, avec nourriture standard et eau *ad libitum*. Afin de vérifier l'absence d'une infection préexistante, des fèces ont été récoltées avant inoculation et testées pour *Cryptosporidium* spp. La manipulation de souris a été effectuée selon le règlement

interne et les normes éthiques de l'Institut Pasteur de Lille pour l'utilisation des animaux de laboratoire, et en accord avec les normes nationales et européennes.

2.2. PARASITES

Les oocystes proviennent de différents fournisseurs selon les expériences (Tableau N° 7). Ils ont été conservés dans du PBS additionné de pénicilline, de streptomycine, de gentamycine ainsi que d'amphotéricine B. Ces suspensions d'oocystes a été maintenues à 4°C jusqu'à leur utilisation. La viabilité des oocystes a été évaluée avant inoculation par un test de désenkystement *in vitro* utilisant une solution de trypsine et de taurocholate (Guyot *et al.*, 2000). L'absence de contamination bactérienne de la suspension d'oocystes a été vérifiée sur milieu PCA (Plate Count Agar) et Sabouraud.

Tableau N° 7. Distribution de différentes espèces de *Cryptosporidium* utilisés

N° de la manipulation animale	Espèces	Souche	Provenance
1	<i>C. muris</i>	RN66	Waterborne Inc. New Orleans, Etats Unis
	<i>C. parvum</i>	IOWA	
2	<i>C. parvum</i>	IOWA	Waterborne Inc. New Orleans, Etats Unis
3	<i>C. molnari</i>	–	Inst. Acuicultura de Torre la Sal (CSIC), Ribera de Cabanes, Castellón, Espagne (Dr. Pilar Alvarez)
4	<i>C. hominis</i>	TU502	Tufts Cummings School of Veterinary Medicine, (Dr. Tzipori)
5	<i>C. parvum</i>	IOWA	Waterborne Inc. New Orleans, Massachusetts Etats Unis
6	<i>C. parvum</i>	TUM1	Tufts Cummings School of Veterinary Medicine (Dr. Tzipori)

2.3. IMMUNODEPRESSION (POUR LES GROUPES CONCERNES)

La dexaméthasone (Dex) liquide (phosphate sodique) (Merck, Lyon, France) est ajoutée à l'eau de boisson, à une concentration de 4 mg/L. L'immunosuppression est commencée 15 jours avant l'inoculation et se poursuit durant toute la durée de l'expérience. Les biberons contenant de la Dex sont renouvelés trois fois par semaine.

2.4. INOCULATION

À l'âge de sept à huit semaines, les souris SCID sont inoculées par gavage gastrique à l'aide d'une sonde courbe. L'inoculum est constitué d'une suspension de 200 µl de PBS contenant 10^5 à 10^8 oocystes de *C. parvum* selon le groupe expérimental. Les souris du groupe témoin TD reçoivent 200 µl de PBS seul. Les souris du groupe témoin TDV reçoivent un volume de suspension d'oocystes correspondant à 10^6 oocystes de *C. parvum*. Avant inoculation, ce volume est filtré sur une colonne Nanosep MF (diamètre des pores du filtre : 0,45 µm) afin de tester l'implication d'éventuels contaminants, biotiques (*e.g.* virus) ou abiotiques, dans la solution de PBS contenant les oocystes.

2.5. SUIVI DE L'INFECTION

Les fèces de chaque souris ont été collectées tous les jours. À cet effet, douze « boîtes propres », de taille réduite, ont été introduites dans l'isolateur afin de permettre la collecte des fèces pendant la durée de l'expérience. La fraîcheur des fèces était garantie par le protocole suivant : Transfert de chaque souris de sa cage vers une boîte propre. Après un délai variant de 20 min à 1 heure environ, la souris était remise dans sa cage et les fèces étaient récupérées à partir de la boîte. Pour cela, les souris d'un même groupe sont transférées dans une cage de transition. Elles sont laissées dans cette cage le temps nécessaire à l'émission d'une dizaine de fèces, qui sont ensuite prélevées et suspendues dans de l'eau MilliQ. La détection et la numération des oocystes dans les selles ont été réalisées par observation au microscope optique après coloration par la technique de Zielh-Neelsen modifiée (Henriksen & Pohlenz, 1981) de gouttes calibrées de suspensions de fèces, ou après purification des oocystes par séparation immunomagnétique (IMS) avec un kit Dynabeads anti-*Cryptosporidium* (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), et marquage immunofluorescent (IF) avec un anticorps anti-*Cryptosporidium* (Cellabs Pty. Ltd, Croissy-Beaubourg, France).

Lorsque les oocystes deviennent détectables dans les selles, la récolte des fèces et l'IMS-IF sont effectuées trois fois par semaine, jusqu'à la fin de l'expérience.

2.6. ÉTUDE CLINIQUE

Afin de suivre l'évolution du poids des souris, des pesées des animaux ont été effectuées tous les 10 jours environ. Parallèlement, les éventuels signes cliniques comme diarrhée, déshydratation, asthénie ou aspect du pelage ont été relevés.

2.7. ÉTUDE HISTOPATHOLOGIQUE

Les souris ont été euthanasiées par injection intracardiaque de pentobarbital sodique (pour quelques manipulations) ou par dislocation du cou (pour des autres), soit au cours des séries de sacrifice prévues, soit durant des euthanasies ponctuelles quand des souris ont montrées un état d'affaiblissement rendant l'euthanasie éthiquement obligatoire. Pour chacune des souris, différents organes ont été prélevés au moment du sacrifice (Figure N° 3) et fixés dans du formol neutre à 10%, avant d'être inclus dans la paraffine. Les coupes histologiques ensuite obtenues ont été colorées à l'Hématoxyline & Eosine pour être observées en microscopie optique. Les altérations histopathologiques ont été caractérisées selon la classification de Vienne (Hamilton *et al.*, 2000; Stolte, 2003; Scoazec, 2007) et selon la classification de tumeurs gastro-intestinales chez les rongeurs (Boivin *et al.*, 2003).

La classification de Vienne pour la classification des tumeurs digestives est un compromis entre les approches occidentale et japonaise, en accord avec les concepts récents d'oncologie moléculaire. Son objectif est de proposer une terminologie unifiée pour la classification histologique de lésions néoplasiques épithéliales du tube digestif, applicable à l'échelon mondial avec une reproductibilité acceptable entre pathologistes. Cette classification se base sur deux critères fondamentaux : Le premier est associé à la présence ou à l'absence d'invasion, au sens biologique du terme, c'est à dire le franchissement de la lame basale sous épithéliale par les cellules néoplasiques. Le deuxième critère est basé en la sévérité de lésions cytologiques et architecturales (Scoazec, 2007). La classification de tumeurs gastro-intestinales chez la souris résulte d'un consensus entre pathologistes. L'objectif était de trouver une classification standard applicable à la souris comme modèle de néoplasie intestinale (Boivin *et al.*, 2003).

Tableau N° 8. Classification de Vienne révisée (Stolte, 2003; Scoazec, 2007).

Catégorie 1	Absence de néoplasie/dysplasie
Catégorie 2	Indéterminé pour la néoplasie/dysplasie
Catégorie 3	Néoplasie intra-muqueuse de bas grade (adénome/dysplasie de bas grade)
Catégorie 4	Néoplasie intra-muqueuse de haut grade 4.1 : adénome/dysplasie de haute grade 4.2 : carcinome non invasif (carcinome <i>in situ</i>) 4.3 : suspicion de carcinome invasif 4.4 : carcinome intramuqueux
Catégorie 5	Carcinome envahissant la sous-muqueuse

Tableau N° 9. Nomenclature pour la classification de tumeurs intestinales chez les rongeurs modifiée (Boivin *et al.*, 2003)

Hyperplasie	Épaississement de la muqueuse, mitoses toujours situées dans la partie profonde, noyaux de localisation basale et sans atypies
Néoplasie intraépithéliale gastro-intestinale	Lésions néoplasiques pre-invasives. Ces lésions sont synonymes de microadenome, microcarcinome, et carcinome <i>in situ</i> .
Adénome	Tumeurs épithéliales bénignes. Elles se subdivisent en catégories selon : <u>Histopathologie:</u> Tubulaire Vilieux <u>Grade de la dysplasie :</u> <u>Bas grade:</u> glandes ou cryptes de forme irrégulière, augmentation de la densité de glands, basophilie et pseudostratification nucléaire. polarité cellulaire normal, chromatine fine. Sécrétion de mucus présente. <u>Haut grade:</u> glandes de forme irrégulière, aspect de fusion, aspects cribriiformes de glandes, pseudostratification nucléaire, noyaux vésiculeux et nucléoles, perte de polarité cellulaire, augmentation de nombre de mitoses, mitoses anormales et localisés dans les zones les plus superficielles de la muqueuse, et notamment dans l'épithélium de surface.
Herniation	Pénétration de glands dans la muscularis mucosae
Adénocarcinome	Néoplasie maligne

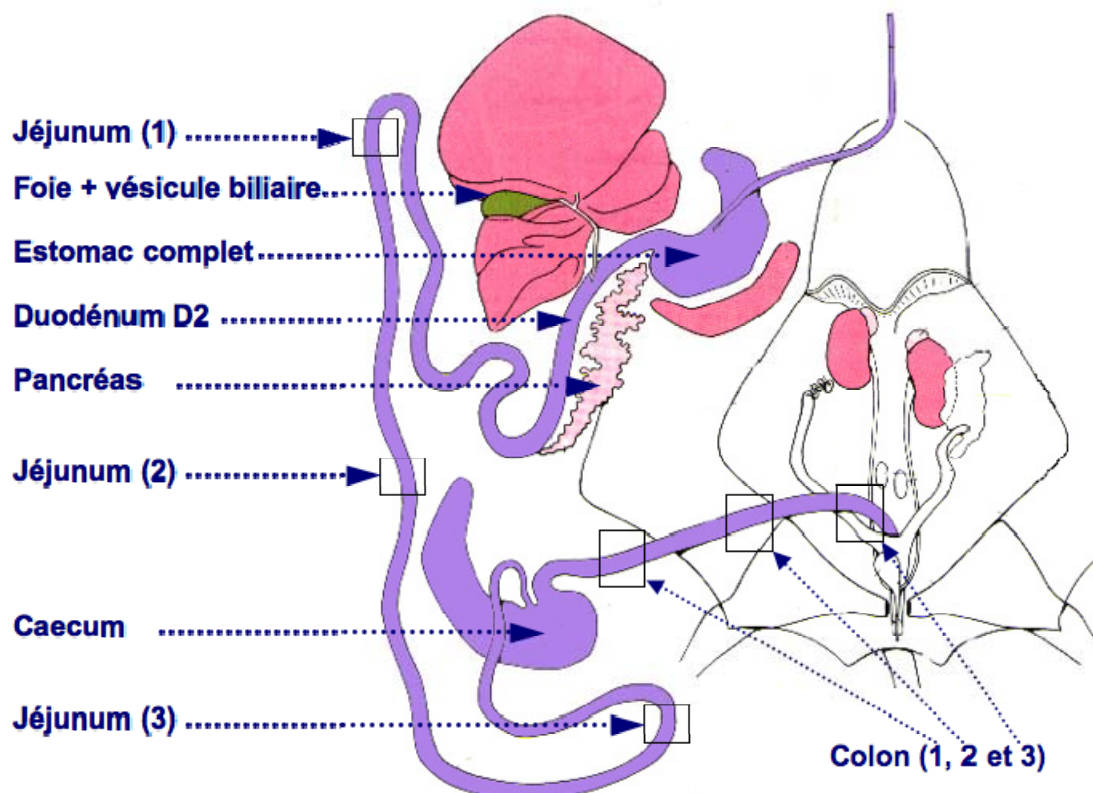


Figure 3. Voici les organes prélevés au moment de l'euthanasie: 1) La totalité de l'estomac, avec une partie de l'œsophage et une partie du duodénum afin de permettre son orientation. 2) Le foie et la vésicule biliaire. 3) La partie D2 du duodénum, associée au pancréas. 4) Une section du jéjunum, environ en son milieu. 5) Trois sections du colon : en son début, et son milieu et à la fin de sa longueur. 6) Le caecum. Dans certains cas les poumons ont été aussi prélevés.

2.8. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Ki-67 s'utilise comme marqueur de prolifération cellulaire. C'est une protéine exprimée dans toutes les phases du cycle cellulaire sauf G0 et début de G1. L'estimation de taux de cellules positives pour le Ki-67 est une des méthodes plus fiables et plus simple pour apprécier la fraction de cellules proliférantes au sein d'un tissu (Abadi, 2003). Le prétraitement de lames paraffinées est effectué au bain Marie dans un tampon citrate pH 6 préparé à partir de citrate de sodium et d'acide citrique, pendant 40 minutes à 99°C. Ensuite, le sérum primaire Ki-67 (Dako, Danemark) est appliqué 2 heures à 37°C à la dilution 1/25. Ultérieurement, le sérum secondaire, polyclonal Rabbit anti-rat biotinylated (Dako, Danemark) est appliqué pendant 2 heures à 37°C à la dilution 1/100.

Le complexe HRP est appliqué 2 heures à 37°C à la dilution 1/100. La révélation se fait effectivement par la DAB (Dako, Danemark), contre coloration des noyaux par l'hématoxyline.

VI. RESULTATS

Les résultats sont présentés en fonction des articles publiés, ou des manuscrits soumis.

1. DONNEES SUR L'EPIDEMIOLOGIE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE

1.1. VENEZUELA

1.1.1. Article 1.

« Cryptosporidiosis in HIV-infected Venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea » (article publié dans *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 73 (1) :54-57).

Dans ce premier travail nous avons exploré la situation de la cryptosporidiose au Venezuela chez les patients infectés par le VIH. Notre étude a permis :

1. D'estimer la prévalence de la cryptosporidiose chez des adultes vénézuéliens infectés par le VIH/SIDA.
2. D'identifier des de facteurs de risque associés à l'infection.
3. D'identifier les principales manifestations cliniques et biologiques associées.
4. D'identifier les infections parasitaires associées à la cryptosporidiose.

Au total, 397 patients examinés à Caracas entre juillet 1997 et août 2002 avec un statut VIH/SIDA confirmé ont été inclus. Lors du recrutement, l'historique clinique de chaque patient et les résultats des tests de laboratoire ont été collectés. Chaque patient a fourni 3 échantillons fécaux pour la réalisation de différentes analyses. Voici la liste de différentes analyses copro-parasitaires choisies: examen microscopique directe, Kato (Willcox & Coura, 1991), Baermann (Willcox & Coura, 1991) et Zielh Neelsen modifié (Henriksen & Pohlenz, 1981).

Les résultats sont les suivants:

1. L'infection par *Cryptosporidium* est fréquente (59/397 patients examinés, 15%) chez les patients infectés par le VIH habitant à Caracas.
2. Il n'a pas été retrouvé de différence de fréquence de la cryptosporidiose selon le sexe.
3. Une augmentation de la prévalence de *Cryptosporidium* en fonction de l'âge des patients a été trouvée.
4. L'étude clinique des patients a détecté la présence de diarrhée, aussi bien aiguë que chronique, avec, fréquemment, plus de 5 selles émises par jour.
5. Il y a une association significative entre la perte de poids et la cryptosporidiose.
6. Ces patients n'ont pas d'éosinophilie périphérique.
7. Un taux de CD4+ <100 cellules/mm³ peut être considéré comme un facteur de risque prédictif de la cryptosporidiose.
8. Le risque d'isosporose est plus faible chez les patients avec cryptosporidiose.

CRYPTOSPORIDIOSIS IN HIV-INFECTED VENEZUELAN ADULTS IS STRONGLY ASSOCIATED WITH ACUTE OR CHRONIC DIARRHEA

GABRIELA CERTAD,* ALEJANDRO ARENAS-PINTO, LEONOR POCATERRA, GIUSEPPE FERRARA,
JULIO CASTRO, ANDREINA BELLO, AND LUZ NÚÑEZ

Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela;
Unidad de Investigación Quirúrgica, Hospital Vargas de Caracas, San José Caracas, Venezuela

Abstract. A cross-sectional study was undertaken to determine the prevalence of cryptosporidiosis and its clinical and laboratory pattern in Venezuelan HIV-infected patients ($N = 397$). At enrollment, they underwent thorough clinical history and physical examination and provided stool specimens for the identification of *Cryptosporidium* sp. and other parasites. *Cryptosporidium* sp. was identified in 59 subjects (15%). This infection was strongly associated with acute and chronic diarrhea, weight loss, $CD4^+$ counts below 100 cells/mm³, older age in patients with leukopenia, and more than 5 stools per day when $CD4^+$ counts were below 100 cells/mm³. In addition, patients with *Cryptosporidium* infection were less likely to be coinfecting with *Isospora belli* (OR = 0.05, $P = 0.001$). In fact, results of the current study confirm the worldwide importance of cryptosporidiosis as a clinically significant opportunistic infection associated with an advanced stage of immunosuppression.

INTRODUCTION

Cryptosporidium sp. is considered an emerging pathogen by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention.¹ This parasite has been reported worldwide, especially infecting immunocompromised persons, and its prevalence varies according to different regions.² A prospective long-term study from Europe suggested that 3-4% of those infected with human immunodeficiency virus (HIV) will have cryptosporidiosis when diagnosed with HIV infection and an equal number will develop it later in the course of their disease.³ No specific effective treatment exists for cryptosporidiosis, and an intact immune system is the major factor to resolve the infection.⁴ In this context, immune system restoration induced by highly active antiretroviral therapy (HAART) emerges as crucially important in those patients with cryptosporidiosis. Unfortunately, cryptosporidiosis remains a clinically significant opportunistic infection in HIV-infected patients without access to HAART, particularly in developing tropical regions.⁵ However, few data exist on the clinical characterization and the epidemiologic aspects of this disease in these countries. We therefore undertook a cross-sectional study of HIV-infected patients to provide some insight into the actual prevalence of cryptosporidiosis in Venezuela and to describe risk factors associated with this infection.

MATERIALS AND METHODS

Study population. This cross-sectional study took place between July 1997 and August 2002. Consecutive adult patients with confirmed HIV infection referred from different health centers to the Parasitology Department of the Faculty of Medicine of Universidad Central de Venezuela, Caracas, were included. These patients were referred to our laboratory as a part of their baseline investigations irrespective of their symptoms. Their informed consent was obtained, and the Research Unit of the "José María Vargas" School of Medicine

and the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) of the Universidad Central de Venezuela approved the project and its ethical aspects.

Clinical evaluation. At enrollment, each participant underwent a thorough clinical history and physical examination and provided laboratory tests when available, such as blood count determination, $CD4^+$ lymphocyte counts, and viral load within 6 months of enrollment. Information obtained via a questionnaire included demographic characteristics, current symptoms, and previous opportunistic infections and treatments.

Stool evaluation. Subjects provided three stool specimens from three different days. All participants were informed about the adequate techniques for sample collection, transport, and preservation. Fecal specimens were processed immediately after they were received. Each sample was divided into 4 portions to perform different coprological analysis: direct method using saline and lugol solutions mainly for the diagnosis of protozoa, Kato for the detection of helminths, Baermann for *Strongyloides stercoralis*,⁶ and Kinyoun stain⁷ for coccidian parasites. Participants were split in two groups: HIV-infected patients with cryptosporidiosis and all the remaining HIV-infected patients.

Definitions. A patient was considered infected with *Cryptosporidium* sp. if this parasite was detected in one or more stool specimens. A stool was considered positive for *Cryptosporidium* sp. if typical oocysts of 5 μ m were observed with the Kinyoun technique. Diarrhea was defined as 3 or more unformed stools in a 24-hour period. A diarrheic episode was defined as acute when it was present for a period shorter than 3 weeks and as chronic if its duration was longer than three weeks. Weight loss was assessed in this study as a subjective appreciation of participants. It was considered significant when referred patients lost more than 10% of their baseline body weight within the period associated with diarrhea. Leukopenia was defined as less than 4,000 leukocytes $\times 10^9/L$ blood.⁸ Relative eosinophilia was defined as more than 4 eosinophils in 100 leukocytes from peripheral blood.⁸ The relative value was considered to be due to the presence of leukopenia in most of the patients.

Statistical analysis. All numerical variables were summarized using mean and 95% confidence intervals if normally distributed or geometric mean if not. Median and inter-

* Address correspondence to Gabriela Certad, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina, "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela. E-mail: gfonbo@cantv.net

quartile range (IQR) were used for those variables that included "0" and were not normally distributed. Categorical data were presented as proportions. Numerical data was also summarized into categories. The Student's *t* test was used to compare the means of continuous variables, whereas categorical variables were compared using Fisher's exact test or χ^2 test.

Univariate and multivariate logistic regression analysis were performed to calculate odds ratios and likelihood ratio tests with *Cryptosporidium* infection as the main outcome. All variables were included in the crude analysis, even other parasite infections. Only those that were statistically significant in the crude analysis were analyzed in the multivariate model. They were checked also for interactions (effect modification). The general significance level was set at *P* value below 0.05. All statistical analysis was performed using Stata 7.0 software.

RESULTS

Descriptive analysis. During the study period, 397 HIV-infected patients were enrolled. They came to our service referred from other health care centers. There were 346 (87%) men and 51 (13%) women with ages ranging from 17 to 63 years, with a geometric mean of 35.8 years (95% CI: 33.8–35.8). Most of the patients came from urban communities; only 11 (3%) came from rural areas. There were 122 (30%) patients with acute diarrhea, 178 (45%) with chronic diarrhea, and 97 (24%) without diarrhea. An evaluation of T-lymphocyte populations revealed that 218 (55%) had CD4⁺ counts with a median of 132 cells/mm³ (IQR: 40–280). In 274 cases (69%), different parasites were detected. The most commonly found were *Blastocystis hominis* (28%), *Cryptosporidium* sp. (15%), *Isospora belli* (14%), *Strongyloides stercoralis* (11%), and *Entamoeba histolytica/dispar* (10%).

We identified the presence of oocysts of *Cryptosporidium* in 59 of 397 patients (15%). Demographic and clinical characteristics of the studied patients are shown in Table 1. The geometric mean age for the patients infected with this parasite was 37.70 years (95% CI: 35.38–40.17). The geometric mean for white blood cells for these infected patients was 3,573 cells/mm³ (95% CI: 2,818.63–4,530.08 cells/mm³), whereas the geometric mean for white blood cells for controls was 4,889.25 cells/mm³ (95% CI: 4,453.85–5,367.23) (*P* = 0.006). In *Cryptosporidium*-infected patients, CD4⁺ lymphocytes ranged from 4 to 412 cells/mm³, with a median of 52 cells/mm³ (IQR: 15–161 cells/mm³). In comparison, the control group had a median of 144 cells/mm³ (IQR: 44–300 cells/mm³) (*P* = 0.006). Laboratory characteristics of the stool samples showed that 20 of 59 (34%) of *Cryptosporidium*-infected patients had mixed infections with other parasites. The most common coinfections were *Blastocystis hominis* in 11 (19%) and *Strongyloides stercoralis* in 4 (7%).

Univariate analysis. In the univariate analysis, patients older than 35 years had an increased risk for cryptosporidiosis (OR = 2.4, 95% CI: 1.3–4.5, *P* = 0.003). Also, the presence of diarrhea (OR = 6.8, 95% CI: 2.1–22.2, *P* < 0.001), more than 5 stools per day (OR = 3.2, 95% CI: 1.2–8.4, *P* = 0.015), weight loss (OR = 2, 95% CI: 1.1–3.5, *P* = 0.017), absence of eosinophilia (OR = 0.4, 95% CI: 0.2–0.9, *P* = 0.015), leukopenia (OR = 2.1, 95% CI: 1.1–4.0, *P* = 0.026), and CD4 count < 100 cells/mm³ (OR = 2.2, 95% CI: 1.1–4.7, *P* =

TABLE 1
Demographic and clinical characteristics of the studied population

	Cryptosporidiosis (N = 59)	Control Group (N = 338)	<i>P</i>
Gender			
Male	53/59 (89.8%)	293/338 (86.7%)	
Female	6/59 (10.2%)	45/338 (13.3%)	0.505
Age			
< 35	16/56 (28.6%)	157/318 (49.4%)	
≥ 35	40/56 (71.4%)	161/318 (50.6%)	0.004
Diarrhea	56/59 (94.9%)	248/338 (73.4%)	< 0.001
Type of diarrhea			
Acute	19/53 (35.8%)	103/248 (41.5%)	
Chronic	34/53 (64.2%)	145/248 (58.5%)	0.444
No. stools per day			
< 5	7/26 (26.9%)	42/78 (53.8%)	
≥ 5	19/26 (73.1%)	36/78 (46.2%)	0.017
Vomiting	8/59 (13.6%)	22/337 (6.5%)	0.060
Abdominal pain	14/59 (23.7%)	72/337 (21.4%)	0.685
Weight loss	26/59 (44.1%)	95/338 (28.1%)	0.014
Hepatomegaly	5/52 (9.6%)	21/297 (7.1%)	0.342
Splenomegaly	3/52 (5.8%)	7/297 (2.4%)	0.175
Leukopenia	20/46 (43.5%)	69/258 (26.7%)	0.022
CD4 count cells/mm ³			
≥ 100	14/33 (42.4%)	115/185 (62.2%)	
< 100	19/33 (57.6%)	70/185 (37.8%)	0.034
Relative eosinophilia			
< 5%	38/45 (84.4%)	175/260 (67.3%)	
≥ 5%	7/45 (15.6%)	85/260 (32.7%)	0.021
HAART			
No	49/59 (83.0%)	284/338 (84.0%)	
Yes	10/59 (17.0%)	54/338 (16.0%)	0.851
<i>Isospora</i> coinfection			
No	56/59 (94.9%)	285/338 (84.3%)	
Yes	3/59 (5.1%)	53/338 (15.7%)	0.018

P values in bold are statistically significant.

0.035) were significantly predictive for the risk of cryptosporidiosis.

Multivariate analysis. In the multivariate analysis (Table 2), cryptosporidiosis was used as the main outcome, and age, diarrhea, number of evacuations per day, weight loss, leukopenia, absence of eosinophilia, CD4⁺ < 100 cells/mm³, and coinfection with *I. belli* were analyzed as explanatory variables. Patients with cryptosporidiosis had a higher risk of developing diarrhea, CD4⁺ count lower than 100 cells/mm³, and weight loss. Additionally, patients with *Cryptosporidium* were less likely to have eosinophilia and to be coinfecting with *I. belli*. As well, *Cryptosporidium*-infected patients were 2.6 times more likely to have 35 years of age or more with a marginal *P* value of 0.058. After adjusting all these ORs by each other, we found an effect modification between leukopenia and age. Those *Cryptosporidium* cases with leukopenia were more likely to be older than 35 years. An effect modification was found between number of stools per day and CD4⁺ count. Patients with cryptosporidiosis and CD4⁺ count lower than 100 cells/mm³ had a 26-fold higher risk of having more than 5 stools per day. There was an interaction between *I. belli* coinfection and eosinophilia. Those *Cryptosporidium* cases with coinfection with *I. belli* were more likely to have 5% of eosinophils or more. *Cryptosporidium* cases without eosinophilia were less likely to have coinfection with *I. belli*.

DISCUSSION

Our data demonstrate that *Cryptosporidium* infection is common among HIV-infected patients living in Caracas with

TABLE 2
Multivariate analysis

Variables	Adjusted OR	95% CI	P	OR ignoring interaction	95% CI	P
Age (< 35 vs. \geq 35)						
In those < 4,000 white cells	1.8	(1.2–162.7)	0.012	1.0		
In those with \geq 4,000 white cells	1.5	(0.4–5.4)	0.492	2.6	(0.9–7.5)	0.058
Diarrhea						
No				1.0		
Yes				6.3	(0.8–48.8)	0.023
No. stools per day (< 5 vs. \geq 5)						
\geq 100 CD4 ⁺ lymphocytes	0.6	(0.03–11.9)	0.737	1.0		
< 100 CD4 ⁺ lymphocytes	25.7	(1.1–584.9)	0.012	3.9	(0.7–21.2)	0.102
Type of diarrhea						
Acute				1.0		
Chronic				1.4	(0.4–4.6)	0.559
CD4 ⁺ lymphocytes						
\geq 100 cells				1.0		
< 100 cells				2.7	(1.0–7.4)	0.047
Weight loss						
No				1.0		
Yes				6.4	(1.9–12.1)	0.002
Relative eosinophilia						
In those without <i>I. belli</i> infection	0.1	(0.03–0.6)	0.003	1.0		
In those with <i>I. belli</i> infection		Not enough patients with coinfection		0.3	(0.07–1.0)	0.031
<i>I. belli</i> Coinfection						
In those with < 5% eosinophils	0.06	(0.01–0.5)	< 0.001	1.0		
In those with \geq 5% eosinophils	1.4	(0.2–9.4)	0.734	0.05	(0.01–0.5)	0.001

OR, odds ratio; CI, confidence interval.
P values in bold are statistically significant.

a prevalence of 15%. No gender difference in the frequency of cryptosporidiosis was found. However, patients older than 35 years had a higher risk for this infection, showing an age-related increase in *Cryptosporidium* prevalence. Such age-related increase for this infection has previously been reported for children.⁹ In our study, there was an interaction between age and leukopenia showing that this age-related risk is probably due to an increased cumulative probability for an advanced immunosuppression in HIV-infected patients.

In relation to the main clinical features of this infection, it was found that the prevalence of watery diarrhea in this patient population was very high, either acute or chronic, with a frequency of more than 5 evacuations daily. In previous studies, it has been described that chronic diarrhea is more common than acute diarrhea in patients with cryptosporidiosis.¹⁰ In our study, there was also a significant proportion of patients with acute diarrhea. One explanation for this could be that these patients were seen immediately after the first symptoms, had access to an appropriate health care unit, and/or had access to a specialized laboratory for the diagnosis of parasitic infections, as has been described before for patients infected with *I. belli*.¹¹

It has been reported that *Cryptosporidium*-infected patients can have a 10% drop in body weight and severe malabsorption too.⁵ Although weight loss was assessed in this study as a subjective appreciation of participants, a significant association was found between this variable and cryptosporidiosis.

Analyzing laboratory results, we found that patients with cryptosporidiosis do not have eosinophilia. Our previous studies have shown that in patients infected by other intestinal coccidia such as *I. belli*, eosinophilia was strongly associ-

ated with isosporiasis.^{11,12} It was observed too that CD4⁺ count reaches statistical significance in the multivariate analyses as a predictor for the risk of cryptosporidiosis. Moreover, the media of CD4⁺ counts for patients with cryptosporidiosis was 52 cells/mm³, confirming previous observations showing that *Cryptosporidium* usually occurs in patients with CD4⁺ counts of < 100 cells/mm³.¹⁰ It has also been described that in patients with CD4⁺ counts of < 150 cells/mm³, *Cryptosporidium* produces a large volume of watery diarrhea that is usually progressive.⁴

The presence of other copathogens was observed. However, after the statistical analysis, it seems that *Cryptosporidium*-infected patients are less likely to get isosporiasis at the same time. This current finding is consistent with other reports that have found lower prevalence of mixed infection by *Cryptosporidium* and *Isospora* compared to single infection with one of these two parasites, even though a similar advanced state of immunosuppression is a main risk factor for both and that they share an oral route of transmission.^{13–15} On the other hand, a previous study has shown a protective immune response of *Isospora felis*-infected mice against *Babesia microti* infection due to cell-mediated immunity.¹⁶ However, whether *Cryptosporidium*-infected gastrointestinal epithelial cells elicit host immune responses remain to be assessed.

In summary, these data indicate that the prevalence of cryptosporidiosis is high among HIV-infected patients living in Caracas. Therefore, we think that the presence of this infection should be suspected in patients from tropical countries not only with chronic watery diarrhea but also with acute diarrhea and weight loss, especially in those with lower CD4⁺ counts. Consequently, it is recommended to consider stool examination for *Cryptosporidium* as a routine in the diagnosis

of causes of diarrhea in HIV-infected patients. Further studies are necessary to define all of the risk factors for this disease.

Received April 24, 2004. Accepted for publication January 19, 2005.

Acknowledgments: We would like to thank Mrs. Isbelia Rada, our laboratory technician. The American Committee on Clinical Tropical Medicine and Travelers' Health (ACCTMTH) assisted with publication expenses.

Financial support: This study was supported by a grant from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) of the Universidad Central de Venezuela.

Authors' addresses: Gabriela Certad, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-562-95-09, Fax: 58-212-562-99-28, E-mail: gfombo@cantv.net. Alejandro Arenas-Pinto, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-562-95-09, Fax: 58-212-562-99-28, E-mail: AArenas-Pinto@gum.ucl.ac.uk. Leonor Pocaterra, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-562-95-09, Fax: 58-212-562-99-28, E-mail: lapocaterra@cantv.net. Giuseppe Ferrara, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-562-95-09, Fax: 58-212-562-99-28, E-mail: picho99@cantv.net. Julio Castro, Unidad de Investigación quirúrgica, Hospital Vargas de Caracas, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-908-04-16, E-mail: jcastron@cantv.net. Andreína Bello, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-562-95-09, Fax: 58-212-562-99-28, E-mail: andreinabm2000@yahoo.es. Luz Núñez, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-562-95-09, Fax: 58-212-562-99-28, E-mail: nenagold@cantv.net.

Reprint requests: Gabriela Certad, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas," Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San José Caracas, Venezuela, Telephone: 58-212-562-95-09, Fax: 58-212-562-99-28, E-mail: gfombo@cantv.net.

REFERENCES

- Guerrant R. 1997. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg Infect Dis* 3: 51-57.
- Griffith JK. 1998. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. *Adv Parasitol* 40: 38-85.
- Pedersen C, Danner S, Lazzarin A, Glauser MP, Weber R, Katlama C, Barton SE, Lundgren JD. 1996. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourin Med* 72: 128-131.
- Kartalija M, Sande M. 1999. Diarrhea and AIDS in the era of highly active anti-retroviral therapy. *Clin Infect Dis* 28: 701-707.
- Chen X, Keithly J, Paya C, LaRusso N. 2002. Cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 346: 1723-1731.
- Núñez L, Arenas A, Comegna M, Guzmán M. 1999. Diarreas parasitarias en pacientes con infección por VIH. *Revista Panamericana de Infectología* 3: 10-16.
- Henricksen SA, Pohlenz JFL. 1981. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22: 594-596.
- Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher K, Petersdorf R, Martin J, Fauci A, Rout R. 1991. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th edition. Vol. 1. McGraw-Hill, International Edition. Appendix A-10.
- Leach Ch, Koo F, Kuhls T, Hilsenbeck S, Jenson H. 2000. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection along the Texas-Mexico border and associated risk factors. *Am J Trop Med Hyg* 62: 656-661.
- Navin T, Weber R, Vugia D, Rimlan D, Roberts J, Addis D, Visvesvara G, Wahlquist S, Hogan S, Gallager L, Juranek D, Schartz D, Wilcox CM, Stewart J, Thompson SE III, Bryan R. 1999. Declining CD4⁺ T-Lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: Results of a 3-year longitudinal study. *J Acq Immune Defic Syndr* 20: 154-159.
- Certad G, Arenas-Pinto A, Pocaterra L, Ferrara G, Bello A, Castro J, Núñez L. 2003. Isosporiasis in venezuelan HIV infected adults: clinical characterization. *Am J Trop Med Hyg* 69: 217-222.
- Arenas-Pinto A, Certad G, Ferrara G, Bello A, Castro J, Núñez L. 2003. Association between parasitic intestinal infections and acute or chronic diarrhea in HIV infected patients in Caracas, Venezuela. *Int J STD AIDS* 14: 487-492.
- Cimerman S, Cimerman B, Lewi S. 1999. Evaluation of the relationship between of intestinal parasitosis and risk factors for HIV infections in AIDS patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 181-185.
- Cranendok RK, Kodde CJ, Chipete D, Zijlstra EE, Sluiters JF. 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Isospora belli* infections among patients with and without diarrhea. *East Afr Med J* 80: 393-394.
- Sauda FC, Zamarioli LA, Ebner Filhow W, Mello L deB. 1993. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos reference center for AIDS, Sao Paulo, Brazil. *J Parasitology* 79: 454-456.
- Takahashi M, Omata Y, Oikawa H, Claveria F, Igarashi I, Sato A, Susuki N. 1993. Protective immune response of *Isospora felis*-infected mice against *Babesia microti* infection. *J Vet Med Sci* 55: 587-590.

1.1.2. Article 2.

« First molecular data on cryptosporidiosis in Venezuela » (article publié dans *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006, 53 (S1) : 30-32)

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer le génotype ainsi que les caractéristiques phénotypiques des populations parasitaires de *Cryptosporidium* sp. au Venezuela. Rien à propos de ces facteurs n'était connu dans ce pays où la prévalence de l'infection symptomatique ou asymptomatique par *Cryptosporidium* dans les écoles primaires peut dépasser 50% d'après des données récentes (Miller *et al.*, 2003). Pour l'étude génotypique des prélèvements fécaux d'origine humaine diagnostiqués positifs pour *Cryptosporidium* par microscopie, une PCR-RFLP ciblant l'ADNr 18S a permis la caractérisation au niveau de l'espèce. Puis un génotypage à des loci mini- et microsatellites, plus polymorphes, a autorisé une résolution à un niveau infra-spécifique.

La récolte d'échantillons de patients vénézuéliens a été effectuée dans les centres suivants: le Laboratoire des Parasitoses Intestinales du service de Parasitologie de l'École de Médecine « José María Vargas » de l'Universidad Central de Venezuela (UCV), le Laboratoire de Géohelminthiases de l'Institut de Médecine Tropicale de l'UCV, le Laboratoire de Parasitologie de l'École de Bioanalyses de l'UCV. Les échantillons ont été collectés dans des conditions adéquates pour permettre leur stockage de manière prolongée. On a aussi inclus des échantillons d'enfants hospitalisés par différentes causes (infection par VIH, insuffisance rénale chronique, diabète, etc.) provenant de l'Hôpital pédiatrique " J.M. de los Ríos " avec le but d'établir un profil de risque pour l'infection par *Cryptosporidium* dans ce groupe.

Les échantillons ont été périodiquement récoltés ensuite dans les différents centres et préparés pour leur envoi en France une fois obtenus tous les permis nécessaires pour leur exportation. Le tableau N°10 montre la distribution des échantillons étudiés. Comme il peut être constaté, 13 échantillons seulement ont été trouvés positifs par PCR. Trois espèces de *Cryptosporidium* infectant les patients vénézuéliens ont été identifiées: *C. hominis*, *C. parvum*, et *C. canis*.

D'autre part, 96 échantillons de buffles (*Bubalus bubalis*, "búfalo de agua") et vaches entre 6 et 10 mois, récoltés dans différents établissements des états Bolivar et Apure ont également été analysés (Tableau N°10). Dans l'analyse des échantillons, on a trouvé 22 échantillons de selles de buffle qui montraient à l'examen microscopique des formes kystiques arrondies acido-alcools résistants, évoquant des oocystes de coccidie (*Cryptosporidium* ou *Cyclospora*) mais en présentant des diamètres trop variés. Toutefois, en répétant la PCR et en employant différentes concentrations d'ADN, il n'a pas été possible de détecter l'ADN de *Cryptosporidium*. Trois échantillons de ces selles, conservés dans du bichromate de potassium à 4°C, ont été mis en culture en gélose bacto-agar pour l'identification d'amibes libres et tous se sont avérés positifs. Les amibes identifiées étaient du genre *Acanthamoeba* (Figure N° 4).

A notre connaissance, ces amibes n'avaient pas été signalées chez *B. bubalis* au Venezuela auparavant. Sur un plan plus général, il est intéressant de remarquer que des échantillons infectés avec des kystes d'*Acanthamoeba* ou d'autres amibes libres, peuvent être à l'origine de faux positifs quand on tente de détecter *Cryptosporidium* dans des préparations colorées au Zielh-Neelsen (Figure N° 4).

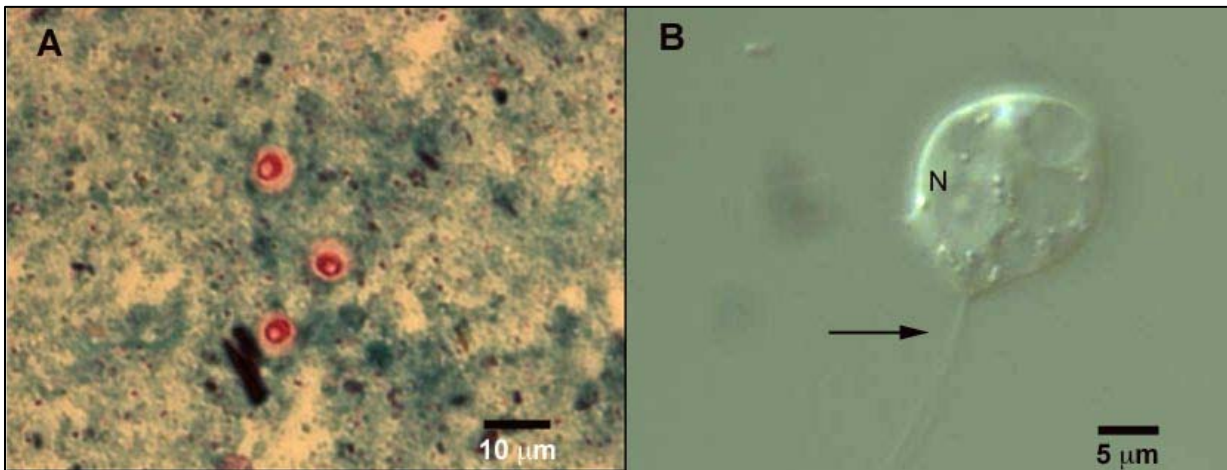


Figure N° 4. A. Observation microscopique de selles de buffles après coloration de Zielh Neelsen modifiée montrant des formes kystiques arrondies acido-alcools résistants évoquant des oocystes de coccidie B. Observation microscopique en contraste interférentiel différentiel (DIC) d'un trophozoïte d' *Acanthamoeba* sp. La flèche montre la projection de un pseudopode. Le noyau (N) est visible aussi.

Tableau N° 10. Distribution des prélèvements coprologiques vénézuéliens

Date de réception	Nombre d'échantillons	Origine	Détection de <i>Cryptosporidium</i> par PCR (nombre des cas positifs)
Sep 2005	24	Patients VIH+	6
Feb 2006	17	Patients VIH+	4
Nov 2006	10	Patients VIH+	3
Nov 2006	58	Enfants provenant de l'hôpital pédiatrique	0
Jul 2007	96	Animaux: Bufles* et vaches	0
Total	205	-	13

* *Bubalis bubalis*

En somme, ce travail a permis:

1. D'identifier trois espèces de *Cryptosporidium* parmi les échantillons fécaux de 13 patients vénézuéliens VIH+: 10 *C. hominis*, 2 *C. parvum*, 1 *C. canis*.
2. L'analyse avec les marqueurs mini- et microsatellites a révélé que les échantillons de *C. hominis* présentaient la même combinaison d'allèles.
3. La PCR n'a pas permis d'amplifier *Cryptosporidium* dans les prélèvements bovins; cependant la culture dans 3 échantillons de *B. bubalis* *Acanthamoeba* été détecté.

First Molecular Data on Cryptosporidiosis in Venezuela

GABRIELA CERTAD,^{a,b} TRAMY NGOUANESAVANH,^a AURORA HERNAN,^b ELSY ROJAS,^b ROSA CONTRERAS,^c
LEONOR POCATERRA,^b LUZ NUÑEZ,^b EDUARDO DEI-CAS^{a,d} and KARINE GUYOT^a

^aÉcologie du Parasitisme (EA 3609), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du professeur Calmette-BP245, 59019 Lille Cedex, France, and

^bCátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, and

^cSección de Geohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, and

^dParasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, France

CRYPTOSPORIDIUM spp. represents a major public health problem world-wide infecting both immunocompetent and immunocompromised persons, and its prevalence varies in different regions (Caccio and Pozio 2006). It remains a clinical significant opportunistic infection in HIV-infected patients especially in those without access to highly active antiretroviral therapy (HAART) living in developing countries (Pozio and Morales 2005). In Venezuela, some studies have documented different prevalence rates of cryptosporidiosis. The first cases were reported in 1985 in immunocompetent children with acute diarrhea (Perez-Schael et al. 1985). Subsequently, in Zulia State the parasite was found among 9% of the native population (Chacin-Bonilla and Sanchez-Chavez 2000). In 2003, *Cryptosporidium* was diagnosed in 89% of children attending day-care centers in Trujillo State (Miller et al. 2003), and in 2005, a prevalence rate of 15% was detected among HIV-infected patients in Venezuela (Certad et al. 2005).

Molecular techniques have been developed to differentiate this parasite at the species and genotype level showing that *C. hominis* and *C. parvum* are responsible for the majority of human cases in most population studied. However, other species linked to clinical manifestations of the disease have been described not only in immunocompromised but also in immunocompetent people (Caccio 2005). Therefore, the molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates is important to improve our understanding of the epidemiology and transmission of the infection. We are not aware of any molecular information on this parasite in Venezuela. In the present study, we characterized specimens from Venezuelan HIV-infected patients using nested PCR–RFLP and sequencing tools, based on the 18S rRNA gene.

PATIENTS AND METHODS

Patients were recruited among confirmed HIV⁺ individuals who volunteered at the Parasitology Department of the Faculty of Medicine of Universidad Central de Venezuela, between February 2005 and January 2006. Their informed consent was obtained. They underwent thorough clinical history evaluation and provided one stool specimen on three different days for diagnosis of *Cryptosporidium* infection.

Oocysts of the parasite were identified by light microscopy using the modified Ziehl Neelsen technique (Henriksen and Pohlenz 1981). Aliquots of positive stool samples were preserved in 2.5% potassium dichromate and shipped to the Pasteur Institut of Lille (France) for molecular analysis. Genomic DNA was isolated and a fragment of the 18S rRNA gene was amplified by nested PCR (Xiao et al. 1999). *Cryptosporidium* species were identified by RFLP analysis (Xiao et al. 1999) using the restriction enzymes

SspI and *AseI*, and were confirmed by sequencing. Each isolate was genotyped at a minisatellite locus (MS5) and at three microsatellite loci (ML1, ML2, MS9) according to the techniques described by Ngouanesavanh et al. 2006.

RESULTS AND DISCUSSION

In the 2005 study reporting 15% prevalence of cryptosporidiosis among HIV-infected patients in Venezuela, those patients had presented CD₄ counts lower than 100 cells/mm³ and 95% of them had acute or chronic diarrhea (Certad et al. 2005). However, there was no information on species identification of the parasite.

In the present study, *Cryptosporidium* sp. in 10 HIV-infected patients was confirmed by PCR. No other intestinal parasites were identified. All these patients came from urban communities in states located at the Central North region of the country (Fig. 1). Three patients came from Vargas state, three from Miranda, two from Distrito Federal, and in two cases the geographical origin of the patients was not determined. Interestingly, patients from Vargas all came from the same area of "Carretera Vieja de La Guaira". This is an area that has been recently affected by two floods in 1999 and 2005 and is inhabited mainly by poor people. In general, the living conditions in this area are precarious.

The characteristics of the patients with *Cryptosporidium* infections are shown in Table 1. All patients were at an advanced stage of immunosuppression. Although CD₄ counts were not measured, 50% of the patients had other concomitant opportunistic infections such as tuberculosis, candidiasis, histoplasmosis or toxoplasmosis. Only two peoples had begun treatment with HAART.

Three species of *Cryptosporidium* were identified among these patients on the basis of the 18S rDNA locus: *C. hominis*, *C. parvum*, and *C. canis* (Fig. 2). The results obtained by RFLP were confirmed by sequencing. Analysis of the sequence of the PCR products corresponding to each species revealed 100% of identity with sequences previously deposited in GenBank.

Cryptosporidium hominis, the predominant species, was found in eight patients out of ten. All the patients with *C. hominis* infection had either acute or chronic diarrhea. This finding of *C. hominis* as the dominant parasite in humans is in agreement with previous observations in other countries such as Peru (Cama et al. 2003), Kenya, Malawi, Brasil, Vietnam (Gatei et al. 2003), and India (Muthusamy et al. 2006). In these countries this parasite species was found responsible for most of the infections among HIV-infected patients. In contrast, most studies in Europe have shown that *C. parvum* is more prevalent than *C. hominis* among immunocompetent and immunosuppressed patients (Joachim 2004).

Other species such as *C. parvum* and *C. canis* can also be found infecting Venezuelan patients and may cause clinical disease. These two zoonotic species were responsible for 11% and 4% of cryptosporidiosis cases, respectively, in HIV-infected patients in Peru (Cama et al. 2003). Interestingly, the only *C. parvum*-infected patient was an asymptomatic child. It has been reported that asymptomatic infection with *Cryptosporidium* sp. can be found

Corresponding Author: G. Certad, Écologie du Parasitisme (EA 3609), Institut Pasteur de Lille, 1, rue du professeur Calmette-BP245, 59019 Lille Cedex, France—Telephone number: +33 3 20 87 71 56; FAX number: +33 3 20 87 72 24; e-mail: gabriela.certad@pasteur.lille.fr

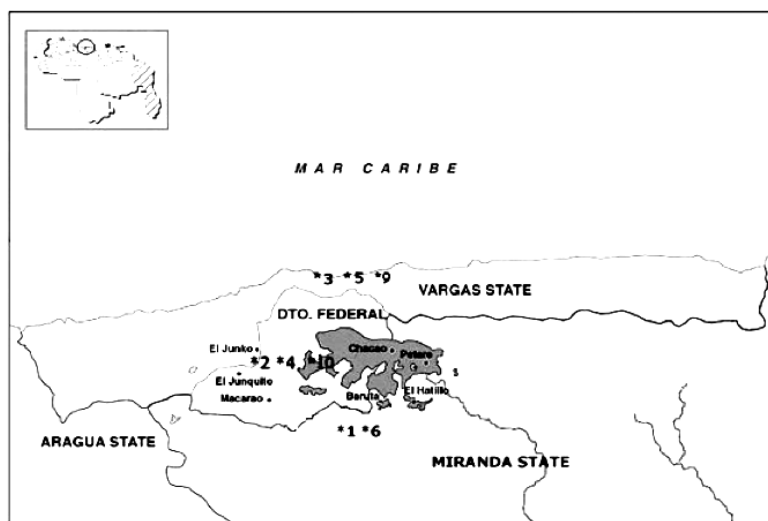


Fig. 1. Geographical distribution of *Cryptosporidium* cases from Venezuela. Vargas State: cases # 3, # 5, # 9; Dto. Federal: cases # 2, # 4, # 10; Miranda State: cases # 1, # 6. The geographical origin of patients # 7 and # 8 was not known.

even among severely immunosuppressed patients without any correlation between species and diarrhea symptoms (Haupt et al. 2005). Additionally, the *C. canis*-infected patient confirmed owning dogs at the time of the infection but it was not possible to test faecal samples from these animals. Close contact between pets and their owners seem to be a risk factor for this infection especially among immunocompromised patients (Joachim 2004).

In this study, five *C. hominis* samples were sub-genotyped with micro- and minisatellite markers. For four of them, the same combination of alleles was found (same multilocus genotype or MLG) with a fragment length of 229, 178, 381, and 301 bp for ML1, ML2, MS5, and MS9, respectively. Only a fragment of 381 bp length for MS9 was obtained for one sample.

The analyzed samples came from diverse regions of the country (Fig. 1) and were collected at different times of the year. In our laboratory in Lille, we found eight different MLGs for *C. hominis* among 51 human samples from France and Haiti using these same markers (Ngouanesavanh et al. 2006). The same MLG as the one identified in this study was found in one HIV-infected patient from Haiti and one French child who visited sub-Saharan Africa.

Despite of the limited number of samples characterized in the present work, we can conclude that anthroponotic transmission seems to play an important role in the epidemiology of cryptosporidiosis in Venezuela. The identification of three different par-

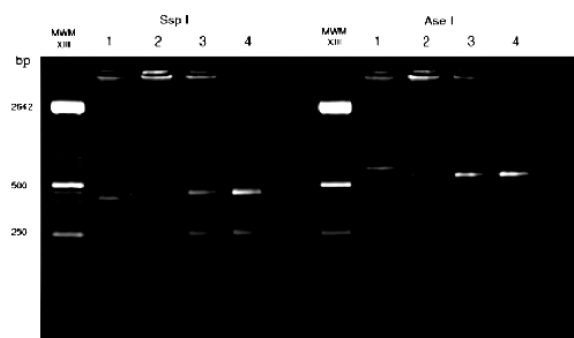


Fig. 2. Restriction fragment length polymorphism patterns for *Cryptosporidium* species isolated from four HIV-infected adults after nested PCR amplification of the 18S rRNA gene and digestion with *SspI* (left side) and *AseI* (right side). Lane 1, case # 1; *C. canis*-infected patient; lanes 2–4, cases # 2–4; *C. hominis*-infected patients.

asite species among HIV-infected patients indicated diverse *Cryptosporidium* infections in this country. Further molecular characterization on more patients should be done to increase the

Table 1. *Cryptosporidium* cases of HIV⁺ patients in Venezuela.

Patient code	Age (yr)	Sex	HIV status	Diarrhea	Other opportunistic infections	HAART	Species
1	73	F	+	+	—	—	<i>C. canis</i>
2	29	M	+	+	Candidiasis	+	<i>C. hominis</i>
3	22	F	+	+	Tuberculosis, toxoplasmosis	—	<i>C. hominis</i>
4	41	M	+	+	—	—	<i>C. hominis</i>
5	31	M	+	+	—	—	<i>C. hominis</i>
6	58	M	+	+	—	+	<i>C. hominis</i>
7	54	F	+	+	Candidiasis, histoplasmosis	—	<i>C. hominis</i>
8	2	M	+	—	Tuberculosis	—	<i>C. parvum</i>
9	49	F	+	+	Tuberculosis	—	<i>C. hominis</i>
10	33	M	+	+	—	—	<i>C. hominis</i>

knowledge base of *Cryptosporidium* transmission and epidemiology in Venezuela.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mrs. Isbelia Rada, the laboratory technician at the Parasitology Department of the Faculty of Medicine of Universidad Central de Venezuela. This work received financial support from the Ministry of Research, France (EA 3609), IFR 142 (Institut Pasteur de Lille), GIS Lille Genopole, and the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico of the Universidad Central de Venezuela. Gabriela Certad was supported by a scholarship from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico of the Universidad Central de Venezuela.

LITERATURE CITED

- Caccio, S. M. 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, **47**:185–192.
- Caccio, S. M. & Pozio, E. 2006. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, **4**:429–443.
- Cama, V. A., Bern, C., Sulaiman, I. M., Gilman, R. H., Ticona, E., Vivar, A., Kawai, V., Vargas, D., Zhou, L. & Xiao, L. 2003. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **50**:531–533.
- Certad, G., Arenas-Pinto, A., Pocaterra, L., Ferrara, G., Castro, J., Bello, A. & Nuñez, L. 2005. Cryptosporidiosis in HIV-infected Venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**:54–57.
- Chacin-Bonilla, L. & Sanchez-Chavez, Y. 2000. Intestinal parasitic infections, with a special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **62**:347–352.
- Gatei, W., Greensill, J., Ashford, R. W., Cuevas, L. E., Parry, C. M., Cunliffe, N. A., Beeching, N. J. & Hart, C. A. 2003. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.*, **41**:1458–1462.
- Henriksen, S. A. & Pohlenz, J. F. 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.*, **22**:594–596.
- Haupt, E. R., Bushen, O. Y., Sam, N. E., Kohli, A., Asgharpour, A., Ng, C. T., Calfee, D. P., Guerrant, R. L., Maro, V., Ole-Nguyaine, S. & Shao, J. F. 2005. Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**:520–522.
- Joachim, A. 2004. Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51**:251–259.
- Miller, S. A., Rosario, C. L., Rojas, E. & Scorza, J. V. 2003. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop. Med. Int. Health*, **8**:342–347.
- Muthusamy, D., Rao, S. S., Ramani, S., Monica, B., Banerjee, I., Abraham, O. C., Mathai, D. C., Primrose, B., Muliyl, J., Wanke, C. A., Ward, H. D. & Kang, G. 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J. Clin. Microbiol.*, **44**:632–634.
- Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Certad, G., Fichou, Y., Chartier, C., Verdier, R. I., Cailliez, J.-C., Camus, D., Dei-Cas, E. & Bañuls, A.-L. 2006. *Cryptosporidium* population genetics: evidence of clonality in isolates from France and Haiti. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**:S33–S36.
- Perez-Schael, I., Boher, Y., Mata, L., Perez, M. & Tapia, F. J. 1985. Cryptosporidiosis in Venezuelan children with acute diarrhea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**:721–722.
- Pozio, E. & Morales, M. A. 2005. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol.*, **21**:58–63.
- Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R. & Lal, A. A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:3386–3391.

1.2. FRANCE ET HAÏTI

1.2.1. Article 3.

« *Cryptosporidium* population genetics : evidences of clonality in isolates from France and Haiti » (article publié dans *Journal of Eukaryotic Microbiology* , 2006, 53 (S1) : 30-32)

L'identification des espèces et génotypes de *Cryptosporidium* est essentielle pour identifier les sources, voies et mécanismes de l'infection par ce parasite, mais elle est rendue difficile par l'insuffisance des clés usuelles de la taxonomie. Dans ce contexte la stratégie choisie a été l'approche moléculaire basée sur l'emploi d'une association de marqueurs mini et microsattellites, très polymorphes. Au cours de ce travail, les principales observations ont été les suivantes :

1. Les espèces suivantes ont été identifiées en France: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis* et *C. felis* chez l'homme et *C. parvum* chez le bétail.
2. Les espèces suivantes ont été identifiées en Haïti chez l'homme: *C. hominis*, *C. parvum* et *C. felis*
3. Les 117 isolats parasitaires des deux pays, se regroupent en fonction des GMLs en 34 ensembles (Tableau N° 1, article N° 3).
4. Des allèles micro- et minisatellites connus et nouveaux ont été détectés et caractérisés.
5. Nous avons identifié une structure génétique à prédominance clonale dans les populations de *Cryptosporidium*.
6. Nous avons de plus observé que l'origine géographique des isolats de *Cryptosporidium* sp. a un rôle structurant sur les populations de ce genre. Ainsi, la situation diffère en France (clonalité fondamentale) et en Haïti, où la clonalité est épidémique, ce qui pourrait répondre à de multiples variables (étendue de l'immunodépression dans les populations humaines,

plus forte transmission interhumaine, infrastructure sanitaire déficitaire, insularité).

7. L'espèce hôte joue également un rôle structurant, au point que *C. parvum* présente des GML différents selon qu'il infecte l'homme ou l'animal (Tableau N° 1, article N° 3).

Cryptosporidium Population Genetics: Evidence of Clonality in Isolates from France and Haiti

TRAMY NGOUANESAVANH,^a KARINE GUYOT,^a GABRIELA CERTAD,^{a,b} YVES LE FICHOUX,^c CHRISTOPHE CHARTIER,^d
ROSE-IRENE VERDIER,^c JEAN-CHARLES CAILLIEZ,^f DANIEL CAMUS,^{a,g} EDUARDO DEI-CAS^{a,h} and ANNE-LAURE
BAÑULS^h

^aEcologie du Parasitisme (EA 3609), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette-BP245, 59019 Lille Cedex, France, and

^bCátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, and

^cParasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, France, and

^dAFSSA Laboratoire d'études et de recherches caprines, Niort, France, and

^eCentre GHESKIO, Port au Prince, Haïti, and

^fLaboratoire Environnement et Santé, Université Catholique de Lille, France, and

^gParasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, France, and

^hGénétique et Evolution des Maladies Infectieuses, IRD, Montpellier, France

THE *Cryptosporidium* species associated with human infection include *C. hominis* (Morgan-Ryan et al. 2002) and *C. parvum* (also a major cause of diarrhea in young livestock); other species and genotypes have also been reported (Caccio et al. 2005). The infection, which is generally self-limited can become chronic in immunocompromised individuals. Several subtyping tools (Caccio et al. 2000; Chalmers et al. 2005; Leav et al. 2002; Mallon et al. 2003b; Wu et al. 2003) are now available and studies using these methodologies have revealed a high degree of nucleotide polymorphism which in turn are potentially helpful in understanding modes of transmission and sources of infections. However, the efficacy of these methods depends on the stability of parasite genotypes with respect to space and time. Because information about recombination rates within parasite populations is very important for such studies, the genetic structures of *Cryptosporidium* populations have to be explored. Mini- or micro-satellite markers have provided useful information in understanding the population structure of other parasites. Many studies have shown that apicomplexan genetic structures are complex varying from quasi-panmixia (random mating among individuals in a population so no genetic disequilibrium occurs) to clonal populations, depending on either transmission intensity (e.g. *Plasmodium falciparum* Anderson et al. 2000) or host ecology (e.g. *Toxoplasma gondii* Ajzenberg et al. 2004). However, *Cryptosporidium* population structure is poorly understood. Clonal populations were strongly suspected, despite the presence of an obligate sexual stage during the *Cryptosporidium* life cycle (Awad-El-Kariem 1999; Widmer 2004). Mallon et al. (2003a), using population genetics, reported variable population structures (clonal or panmixia) among *Cryptosporidium* isolates from Scotland. Our study aims to assess the situation in France and Haiti.

MATERIALS AND METHODS

***Cryptosporidium* isolates.** Fifty-four human stool samples from sporadic cryptosporidiosis cases were obtained from parasitology laboratories of universities' hospitals in France between 1997 and 2000. Forty-nine human samples were collected from patients of the "Haitian Study Group on Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections" Center (GHESKIO) or of the University Hospital of Haiti, Port-au-Prince in 2000. Seven calf and seven goat fecal samples containing *Cryptosporidium* sp. were

Corresponding Author: T. Ngouanesavanh, Ecologie du Parasitisme, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette-BP245, 59019 Lille Cedex, France—Telephone number: +33 3 2087 7156; FAX number: +33 3 2087 7224; e-mail: tramy.ngouanesavanh@pasteur-lille.fr

provided by the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) of Niort, through a survey program of French farms between 1997 and 2003. Multilocus genotypes (MLGs) were characterized for each isolate according to host species (Table 1). Data from calves and goats were also combined to obtain information on population genetics.

DNA extraction. DNA from *Cryptosporidium* oocysts was performed by a modification of methods previously described (Guyot et al. 2001). Cetyltrimethylammonium bromide treatment was deleted and an additional polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) treatment was performed.

Genotyping. Analysis of the 18S rDNA marker was used to determine the *Cryptosporidium* species and genotype of each isolate (Guyot et al. 2001; Xiao et al. 1999). Then, each isolate was genotyped at a minisatellite locus (MS5) and at three micro-satellite loci (ML1, ML2, MS9), using primers previously described (Caccio et al. 2000; Caccio, Spano, and Pozio 2001; Mallon et al. 003a), with a slight modification of MS5 reverse primer (5'-GTATGCTGGGGAATATAGCCAAAG-3'). For each pair of primers, one of the pair was labeled with carboxyfluorescein or hexachlorofluorescein. PCR mixtures consisted of 1 × PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.4 μM of both primers (Eurogentec, Seraing, Belgium), 0.75 U of AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) and the DNA template. DNA amplification was carried out on a PTC 200 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA) operated at 94 °C for 10 min, then 40 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C (57 °C for MS5) for 30 s, and 72 °C for 30 s. A final step at 72 °C for 45 min was used to optimize the terminal nucleotide addition.

The size of the DNA amplification product was determined on a 3730 XL ABI DNA Analyzer and by data analysis using Analyse GeneMapper 3.0. MLGs were obtained for each isolate by the combination of the four mini- and microsatellite alleles. When two alleles were identified at one locus, the two potential MLGs were considered. When more than one locus showed several alleles, MLGs could not be determined and the isolate was excluded from the population genetic analyses.

Genetic diversity analysis. From MLGs, phenetic relationships among isolates were explored by an unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis (Sneath and Sokal 1962). Phenetic relationships refer to observable or measurable similarities or differences, not based on ancestral relations among individuals or evolutionary relationships. Similarities or differences can be based on genetic data. A dendrogram was computed using three softwares: Genetics Toolbox (GEMI laboratory, UMR CNRS-IRD 2724, Montpellier, France),

Table 1. Multilocus genotype (MLG) distribution: comparisons between host species and *Cryptosporidium* species.

MLG	Locus				Human isolates		Calf isolates	Goat isolates	Total
	MS5	MS9	ML1	ML2	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	
1	na	471	226	175	—	2	—	—	2
2	na	471	226	229	—	1	—	—	1
3	205	381	235	178	1	—	—	—	1
4	262	459	232	180	—	1	—	—	1
5	262	477	226	175	—	1	—	—	1
6	262	534	226	199	—	2	—	—	2
7	262	534	226	201	—	15	—	—	15
8	277	na	229	178	1	—	—	—	1
9	277	381	229	178	4	—	—	—	4
10	280	459	238	227	—	1	—	—	1
11	280	459	238	229	—	1	—	—	1
12	286	495	226	175	—	1	—	—	1
13	286	534	226	199	—	4	—	—	4
14	286	534	226	202	—	1	—	—	1
15	301	381	229	178	3	—	—	—	3
16	301	381	235	177	1	—	—	—	1
17	301	381	235	178	1	—	—	—	1
18	325	381	226	178	1	—	—	—	1
19	325	381	229	178	41	—	—	—	41
20	328	na	226	191	—	1	—	—	1
21	328	438	226	190	—	—	—	2	2
22	328	441	226	191	—	—	—	1	1
23	328	447	226	214	—	—	1	—	1
24	328	459	238	175	—	1	—	—	1
25	328	459	238	223	—	—	1	—	1
26	328	459	238	225	—	—	2	—	2
27	328	459	238	226	—	1	1	1	3
28	328	459	238	227	—	4	2	1	7
29	328	459	238	228	—	1	1	1	3
30	328	459	238	229	—	5	—	—	5
31	328	465	226	230	—	—	1	—	1
32	328	465	226	232	—	—	1	—	1
33	328	465	238	226	—	—	1	—	1
34	328	465	238	228	—	—	1	—	1

na, no amplification (at least three PCR attempts) = null allele.

PHYLIP (Felsenstein, 1993, 3.5c ed. Seattle, WA, Department of Genetics, University of Washington), and TreeDyn (Chevenet, Banuls, and Barnabe 2000). To study the distribution of genetic variability in the *Cryptosporidium* population, genotypic diversity (Pasteur, Pasteur, and Bonhonime 1987) and mean genetic diversity (Selander and Levin 1980) indexes were calculated.

Population genetics. As *Cryptosporidium* oocysts are haploid, population structure was explored by a set of complementary statistical recombination tests (Tibayrenc 1995; Tibayrenc, Kjellberg, and Ayala 1990). These tests take as null hypothesis, a panmictic situation and explore several criteria of clonality: over-representation of some MLGs (tests *d1* and *d2*), under-representation of others (test *e*), and non-random association of independent genetic loci (test *f*). Values lower than 5×10^{-2} for *d1*, *d2*, *e*, and 10^{-2} for *f* were considered statistically significant (Tibayrenc et al. 1991, 1990). Results provide complementary indications on different manifestations of linkage disequilibrium, an important feature of clonal population structure.

To distinguish basic from epidemic clones (i.e. occasional spread of clonal genotypes into basically sexual species), test *f* was also performed considering each group of isolates with the same MLG as one individual (test “*f* bis”). Under these conditions, persistent linkage disequilibrium would indicate a predominant clonal evolution and a non-persistent one would indicate epidemic clones (Smith et al. 1993).

RESULTS AND DISCUSSION

After 18S rDNA typing was performed, four species were identified: *C. parvum* bovine genotype (42 from human and 14 from animal), *C. hominis* (51 human isolates), *C. meleagridis* (three human isolates), and *C. felis* (seven human isolates). DNA amplification was obtained at the four mini- or microsatellite loci for most *C. parvum* and *C. hominis* isolates. New and previously described alleles were found. When DNA failed to be amplified, a null allele was inserted into the analysis. Allele distribution according to parasite species was consistent with published results (Caccio et al. 2000, 2001; Mallon et al. 2003a). *C. meleagridis* DNA was amplified only at the MS9 (306-bp) locus. We failed to obtain DNA amplification of the *C. felis* isolates. These results are consistent with previous data describing *C. meleagridis* as phylogenetically closer to *C. parvum* and *C. hominis* than to *C. felis* (Xiao et al. 1999). *C. meleagridis* and *C. felis* were not included in the genetic analysis.

Thirty-four MLGs were identified (Table 1). So far, we have not identified any MLG shared by *C. parvum* and *C. hominis*. Most of the *C. parvum* MLGs found in humans were not found in animals (Table 1), supporting the hypothesis that transmission of *C. parvum* among humans is non-zoonotic (Alves et al. 2003; Mallon et al. 2003a, b). However, because calf and goat isolates share some MLGs, a greater number of highly polymorphic markers are required to obtain better resolution. Targets like the *gp15*

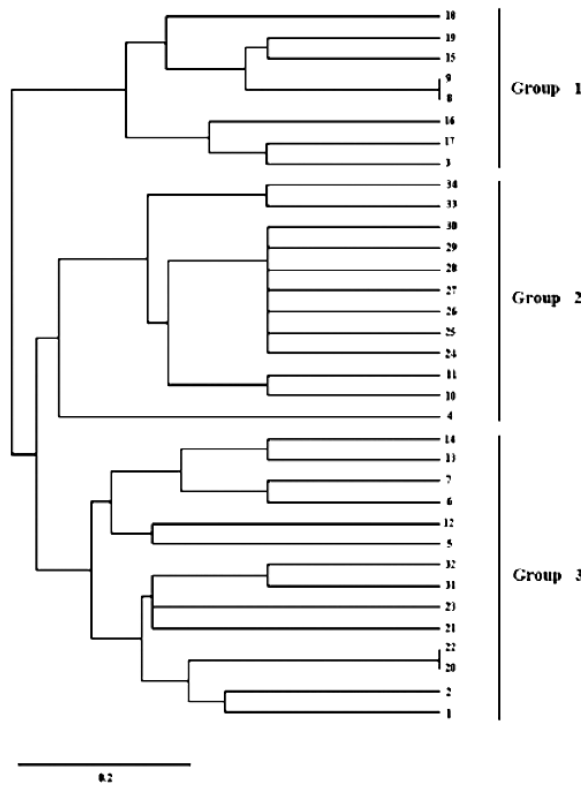


Fig. 1. Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram constructed from a Jaccard's distance matrix exploring the relationships between the *Cryptosporidium* multilocus genotypes (MLGs). Multilocus genotypes clustered into three groups. Group 1 (eight MLGs) included all the *C. hominis* isolates. Group 2 (12 MLGs) and the group 3 (14 MLGs) included all the *C. parvum* isolates.

locus or some other discriminating method (such as the SSCP analysis of pITS-2 Chalmers et al. 2005), could be combined with the set of markers used here to provide more robust analyses.

The dendrogram clustered MLGs into three groups (Fig. 1). Group 1 encompassed all *C. hominis* (French or Haitian) while all the *C. parvum* (from human or animal isolates) clustered in groups 2 or 3. Groups 2 and 3 were linked but did not seem to be correlated either to the geographical origin or to the host species.

Recombination tests revealed strong linkage disequilibrium (Table 2), which favor clonal evolution of *C. hominis* and *C. parvum* populations. In *C. hominis* isolates, a non-persistent linkage disequilibrium revealed epidemic clones. The *C. parvum* group (isolates from humans and animals) showed a basic clonal pattern. However, closer inspection of the *C. parvum* group subdivisions resulting from the UPGMA analysis (groups 2 and 3, Fig. 1) revealed disparity, with results supporting either panmixia in the *C. parvum* group 2 or epidemic clonality in the *C. parvum* group 3 (Table 2). Therefore, we confirmed the findings of (Mallon et al. 2003a) by showing that the *Cryptosporidium* population genetic structure was complex in France and Haiti. In a separate study (Tanriverdi and Widmer 2006), similar levels of polymorphism between *C. parvum* and *C. hominis* were detected, which suggested that the low number of *C. hominis* MLGs detected by (Mallon et al. 2003a) resulted from a clonal expansion of certain genotypes rather than from a restricted level of polymorphism. Our results indicated that there is lower genetic diversity within the *C. hominis* population than within the *C. parvum* population, although both populations displayed characteristics of being clonal populations (Table 2). Considering host species restrictions, it could be speculated that *C. hominis* originated from a *C. parvum* lineage after adaptation to the human host.

When the results on French and Haitian *C. parvum* and *C. hominis* human isolates were separated, the analyses showed a clonal structure in France that was basic in *C. parvum* and either basic or epidemic in the *C. hominis* population (Table 2). In Haiti, *C. hominis* and *C. parvum* exhibited only three and two MLGs, respectively, which precluded analysis of linkage disequilibrium. However, this low degree of polymorphism could be interpreted as a sign of epidemic clonality. Moreover, in *C. hominis* as well as in *C. parvum*, genetic and genotypic diversities were markedly

Table 2. *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals: Genetic diversity indexes and recombination tests.

Group	# of isolates	# of MLGs	Mean genetic diversity	Genotypic diversity	Recombination tests ^a				
					<i>dl</i> ^a	<i>d2</i>	<i>E</i>	<i>f</i>	<i>fbis</i>
<i>C. hominis</i> (Group 1) ^b	51	8	0.19	0.16	$1.6 \times 10^{-8*}$	10^{-4*}	$1.2 \times 10^{-3*}$	10^{-4*}	0.74
<i>C. parvum</i>	56	26	0.66	0.44	$1.2 \times 10^{-14*}$	10^{-4*}	10^{-4*}	10^{-4*}	10^{-4*}
Group 2 ^c	27	12	0.31	0.44	5.9×10^{-2}	0.46	0.39	0.53	0.54
Group 3 ^c	34	14	0.46	0.41	$2.1 \times 10^{-4*}$	10^{-4*}	10^{-4*}	10^{-4*}	2.8×10^{-2}
Human isolates									
<i>C. hominis</i>									
Haiti	31	3	0.03	0.09	na	na	na	na	na
France	20	7	0.26	0.33	0.19	$2 \times 10^{-2*}$	0.35	1.4×10^{-2}	na
<i>C. parvum</i>									
Haiti	16	2	0.03	0.12	na	na	na	na	na
France	26	16	0.59	0.48	$4.4 \times 10^{-6*}$	$6 \times 10^{-4*}$	$<10^{-4*}$	$<10^{-4*}$	$<10^{-4*}$
Isolates from farm animals									
<i>C. parvum</i>									
France	12	12	0.49	0.67	$2.5 \times 10^{-3*}$	0.13	$2 \times 10^{-4*}$	$1.2 \times 10^{-3*}$	2.1×10^{-2}

^aThe most significant value obtained in the *dl* test is shown. Test *dl* is a combinatory analysis that gives a value for each MGL represented more than once in the population of interest. Only the most significant for each population is shown.

^b*C. hominis* = Group 1. *C. hominis* was identified by 18S rDNA typing and shown as Group 1 in the UPGMA tree (Fig. 1).

^c*C. parvum* was identified by 18S rDNA typing. Separation of groups 2 and 3 was justified by the groupings found by the UPGMA dendrogram analysis (Fig. 1).

lower among the Haitian human isolates than in those from France.

The collection of samples in both countries were done under different conditions. However, it can then be speculated that the divergence observed among the Haitian specimens might also be due to living conditions there. Haiti is the poorest country in the Western Hemisphere and AIDS has become the leading cause of death among adults (AIDS Epidemic Updates 2004). Promiscuity, malnutrition, and poor sanitation are commonly encountered. These conditions are conducive for person-to-person transmission of parasites. Self-fertilization or the predominance of same or similar genotypes recombining could explain a clonal population structure and the low number of MLGs.

In France, comparison between *C. parvum* populations from human and animal origins revealed divergent genetic structures. The human *C. parvum* population exhibited basic clonality while the animal *C. parvum* population had characteristics of epidemic clonality (Table 2). There was lower genotypic diversity among the human isolates and a lower prevalence of mixed infections compared with the animal isolates. Selection pressure could therefore be stronger in humans than in the animal hosts. Treatment of patients included in this study might induce selection but this kind of patient history information was not available.

Finally, we found only three MLGs that were shared by human and animal *C. parvum* isolates; most *Cryptosporidium* MLGs seemed to be restricted to parasites in a specific host species. Therefore, specific host species genotype sub-structure might be present. An increased number of animal isolate samples and survey of isolates from a broader range of host species are required to explore this aspect issue.

ACKNOWLEDGMENTS

Cryptosporidium samples were kindly provided by: C. Sarfati (Hôpital Saint-Louis, Paris), J. Poirriez (CH, Dunkerque), E. Dutoit and J.M. Dewitte (CHRU, Lille), M. Miegville (CHU, Nantes), L. De Gentile (CHU, Angers), B. Degeilh (CHRU, Rennes) and M. Deniau (Hôpital Henri Mondor, Créteil). Charlotte Cousin provided technical assistance. This work received financial support from the Ministry of Research, France (EA 3609). T. N. was supported by a French Ministry of Research grant.

LITERATURE CITED

- Ajzenberg, D., Banuls, A. L., Su, C., Dumetre, A., Demar, M., Carne, B. & Darde, M. L. 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **34**:1185–1196.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A. A., Matos, O. & Antunes, F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.*, **41**:2744–2747.
- Anderson, T. J., Haubold, B., Williams, J. T., Estrada-Franco, J. G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I. D., Brockman, A. H., Nosten, F., Ferreira, M. U. & Day, K. P. 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol. Evol.*, **17**:1467–1482.
- Awad-El-Kariem, F. M. 1999. Does *Cryptosporidium parvum* have a clonal population structure. *Parasito Today*, **15**:502–504.
- Caccio, S., Homan, W., Camilli, R., Traldi, G., Kortbeek, T. & Pozio, E. 2000. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, **120**:237–244.
- Caccio, S., Spano, F. & Pozio, E. 2001. Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Int. J. Parasitol.*, **31**:1082–1086.
- Caccio, S. M., Thompson, R. C., McLauchlin, J. & Smith, H. V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.*, **21**:430–437.
- Chalmers, R. M., Ferguson Caccio, C., Gasser, R. B., Abs EL-Osta, Y. G., Heijnen, L., Xiao, L., Elwin, K., Hadfield, S., Sinclair, M. & Stevens, M. 2005. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int. J. Parasitol.*, **35**:397–410.
- Chevenet, F., Banuls, A. L. & Barnabe, C. 2000. TreeDyn: un éditeur interactif d'arbres phylogéniques. In: Caraux, G., Gascuel, O. & Sagot, M. F. (ed.). Actes des Premières Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques. ENSAM/LIRMM, Montpellier. p. 87–90.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J. C., Camus, D. & Dei-Cas, E. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.*, **39**:3472–3480.
- Leav, B. A., Mackay, M. R., Anyanwu, A., O'Conner, R. M., Cevallos, A. M., Kindra, G., Rollins, N. C., Bennis, M. L., Nelson, R. G. & Ward, H. D. 2002. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cppp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect. Immun.*, **70**:3881–3890.
- Mallon, M., MacLeod, A., Wastling, J., Smith, H., Reilly, B. & Tait, A. 2003a. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *J. Mol. Evol.*, **56**:407–417.
- Mallon, M. E., MacLeod, A., Wastling, J. M., Smith, H. & Tait, A. 2003b. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* type 2: population genetics and sub-structuring. *Infect. Genet. Evol.*, **3**:207–218.
- Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R. C., Olson, M., Lal, A. & Xiao, L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **49**:433–440.
- Pasteur, N., Pasteur, G. & Bonhomme, F. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Techniques et documentation. Lavoisier, Paris, 213 p.
- Selander, R. K. & Levin, B. R. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science*, **210**:545–547.
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M. & Spratt, B. G. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:4384–4388.
- Sneath, P. H. & Sokal, R. R. 1962. Numerical taxonomy. *Nature*, **193**:855–860.
- Tanriverdi, S. & Widmer, G. 2006. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infect. Genet. Evol.*, **6**:113–122.
- Tibayrenc, M. 1995. Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C. R. Acad. Sci. III*, **318**:135–139.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, F. J. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:2414–2418.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Breniere, S. F., Darde, M. L. & Ayala, F. J. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:5129–5133.
- Widmer, G. 2004. Population genetics of *Cryptosporidium parvum*. *Trends Parasitol.*, **20**:3–6.
- Wu, Z., Nagano, I., Boonmars, T., Nakada, T. & Takahashi, Y. 2003. Intraspecific polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:4720–4726.
- Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R. & Lal, A. A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:3386–3391.

1.3. IRAN

1.3.1. Article 4.

« Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran » (article publié dans *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (3) : 1033-1035)

Pour explorer la composition des populations de *Cryptosporidium* spp en Iran, une première étude a été conduite chez l'homme et chez l'animal. Rien à propos de l'épidémiologie de la cryptosporidiose n'était connu dans ce pays avant notre travail. Pour l'étude génotypique, des échantillons fécaux de 15 personnes et 9 animaux (7 vaches et deux dindes) diagnostiqués positifs pour *Cryptosporidium* par microscopie ont été étudiés. Des PCR-RFLP ciblant l'ADNr 18S et le locus Laxer ont permis la caractérisation au niveau de l'espèce des isolats parasites. Les résultats sont les suivants:

1. Deux espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées parmi les échantillons fécaux de 15 personnes: *C. parvum* et *C. hominis*, chez 11 et 4 patients respectivement. *C. parvum* été trouvé chez toutes les vaches et *C. meleagridis* chez les dindes.
2. Parmi les échantillons de *C. parvum*, le sous-génotype L1 (Laxer) a été le seul sous génotype retrouvé chez les animaux. Il a aussi été trouvé de façon majoritaire chez les humains.
3. La prédominance de *C. parvum* sous-génotype L1 suggère une transmission prédominante de type zoonotique en Iran.

Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Isolates from Humans and Animals in Iran[∇]

Ahmad Reza Meamar,¹ Karine Guyot,² Gabriela Certad,² Eduardo Dei-Cas,² Mino Mohraz,³
Mehdi Mohebali,¹ Kazem Mohammad,⁴ Amir Ali Mehbod,¹
Sasan Rezaie,¹ and Mostafa Rezaian^{1*}

Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran¹; Parasitology-Mycology Service, Microbiology Department, EA3609 Faculty of Medicine, Lille 2 University, University Hospital Centre and IFR-142, Lille Pasteur Institute, Lille, France²; Department of Infectious Diseases, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran³; and Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran⁴

Received 24 April 2006/Accepted 18 November 2006

Isolates of *Cryptosporidium* spp. from human and animal hosts in Iran were characterized on the basis of both the 18S rRNA gene and the Laxer locus. Three *Cryptosporidium* species, *C. hominis*, *C. parvum*, and *C. meleagridis*, were recognized, and zoonotically transmitted *C. parvum* was the predominant species found in humans.

Cryptosporidium is an apicomplexan parasite that infects humans and a wide range of domestic and wild animals. It is responsible for significant diarrheal diseases in both developing and developed nations. Molecular biology has provided powerful new tools for characterizing *Cryptosporidium* and has revealed considerable variation within the genus. Currently, 16 species are recognized (22), of which 7 infect susceptible immunocompetent and immunocompromised individuals. *C. parvum* and *C. hominis* are the species predominantly found in humans, but others, such as *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. canis*, and *C. suis*, have also been occasionally identified (3, 27).

Cryptosporidium has been previously reported in Iran (1, 10, 14, 17, 29), but apart from one documented case, in which a *C. parvum* infection was reported in the respiratory tract of an Iranian AIDS patient (14), no data are available on the molecular identification of the species infecting humans and animals in this country. Therefore, the present study was undertaken to identify *Cryptosporidium* species in human and animal hosts and to explore the transmission patterns of infection among them.

Specimens, DNA isolation, and *Cryptosporidium* genotyping. Totals of 15 human and 9 animal stool specimens, collected from 2002 to 2005 in Iran and diagnosed positive for *Cryptosporidium* by acid-fast staining, were analyzed (Table 1). DNA was extracted using a QIAamp DNA stool kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. All specimens were genotyped on the basis of the 18S rRNA gene by nested PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) (25, 26, 28) and sequencing (8). *Cryptosporidium* species were further confirmed by a Laxer sequence-

based tool as previously described (9). Indeed, distinct Laxer PCR-RFLP patterns allowed the differentiation of *C. hominis*, *C. parvum*, and *C. meleagridis*, even distinguishing between two subgenotypes of *C. parvum*, as a result of DNA variation within this species (9).

***Cryptosporidium* species identified.** DNA of all specimens yielded products of the expected 830-bp size by nested PCR of the 18S rRNA gene. Genotyping results from RFLP analysis of the amplified product were in agreement with those from DNA sequencing. The obtained 18S rRNA gene sequences matched the sequences previously deposited in GenBank. In the present study, *C. parvum* was identified in isolates from seven human immunodeficiency virus (HIV)-infected adults, four children, and seven cattle, whereas *C. hominis* was identified in isolates from one HIV-infected adult and three children. The third species, *C. meleagridis*, was identified in two turkey isolates (Table 1).

Results obtained by analysis of the Laxer DNA fragment were in agreement with those for the 18S rRNA gene locus (Table 1), except for three isolates in which, in spite of repeated attempts, DNA failed to amplify (the lower sensitivity of the PCR assay at the Laxer locus is the probable explanation). In human isolates, both the L1 and the L2 subgenotypes of *C. parvum* were recovered, while in cattle isolates, only the L1 subgenotype was found (Table 1).

***Cryptosporidium* species in HIV-infected adults and in children.** Recent studies on cryptosporidiosis in HIV-infected adults and children in Iran have shown prevalences of 1.5% and 7%, respectively (10, 29). In the present study, the species responsible for cryptosporidiosis in Iranian patients were identified. Accordingly, in HIV-infected adults, *C. parvum* was more frequently identified than *C. hominis*. In contrast, in children, no significant difference in the distribution of *Cryptosporidium* species (*C. parvum* versus *C. hominis*) was observed. This pattern of *Cryptosporidium* species distribution in adults and children in Iran seems different from those in other

* Corresponding author. Mailing address: Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, P.O. Box 14155-6446, Tehran, Iran. Phone: 98 21 88951392. Fax: 98 21 66462267. E-mail: rezaiian@sina.tums.ac.ir.

[∇] Published ahead of print on 1 December 2006.

TABLE 1. Isolates of *Cryptosporidium* genotyped in this study

Isolate code	Host ^a	<i>Cryptosporidium</i> sp. identified by indicated method	
		18S rRNA gene sequencing	Laxer sequencing
H1	Human (adult/HIV+)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
H2	Human (adult/HIV+)	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>
H3	Human (adult/HIV+)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
H4	Human (adult/HIV+)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L2 subgenotype)
H5	Human (adult/HIV+)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
H6	Human (adult/HIV+)	<i>C. parvum</i>	No DNA amplification
H7	Human (adult/HIV+)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
H8	Human (adult/HIV+)	<i>C. parvum</i>	No DNA amplification
H9	Human (child)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
H10	Human (child)	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>
H11	Human (child)	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>
H12	Human (child)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
H13	Human (child)	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>
H14	Human (child)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
H15	Human (child)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
C1	Cattle	<i>C. parvum</i>	No DNA amplification
C2	Cattle	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
C3	Cattle	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
C4	Cattle	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
C5	Cattle	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
C6	Cattle	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
C7	Cattle	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (L1 subgenotype)
T1	Turkey	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>
T2	Turkey	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. meleagridis</i>

^a HIV+, HIV positive.

countries, such as Peru, Thailand, Malawi, Uganda, Kenya, South Africa, and South India, where *C. hominis* is by far dominant either in HIV-infected adults or in children (7, 11, 15, 18, 19, 23–25). However, in European countries, *C. parvum* is slightly more commonly identified than *C. hominis* in both immunocompetent and immunocompromised individuals (2, 4, 8, 13). Recently, *C. parvum* was also identified in children in Kuwait (21).

In the present study, among the *C. parvum* isolates, the L1 subgenotype was predominant, as it was identified in eight human cases out of nine and in all cattle cases. Interestingly, this subgenotype has also been the only one found in all cattle isolates from France and Tunisia, whereas both the L1 and the L2 subgenotypes were retrieved in humans from the same countries (K. Guyot, unpublished data). The failure to detect the L2 subgenotype in animals in the current study is in agreement with recent subtyping studies showing that not all *C. parvum* infections in humans are the result of zoonotic transmission (2, 12, 16). Indeed, this type of *C. parvum* would infect humans through anthroponotic transmission. Thus, it could be hypothesized that the adult infected by the H4-related isolate acquired the pathogen by an anthroponotic pathway.

***Cryptosporidium* species in animals.** Prior to this work, *Cryptosporidium* parasites had been reported in cattle in Iran (17), but the present study reports the first molecular characterization of these protists in animals from this country. *C. parvum* has been the sole species identified in cattle. Other *Cryptosporidium* species reported to infect these animals, such as *C. bovis*, *C. andersoni*, and the *Cryptosporidium* deer-like genotype (5, 6, 20), were not found here. This work is also the first report of *C. meleagridis* infecting turkeys in Iran.

Conclusion. Few published reports on *Cryptosporidium* are available in the Middle East. In this study, despite the relatively small number of isolates characterized, the clear predominance of *C. parvum* in Iranian people might be considered the result of zoonotic transmission. However, more comprehensive epidemiological studies are needed to elucidate accurately the source of *Cryptosporidium* infection. Especially, further subtyping of *C. parvum* and *C. hominis* isolates using highly polymorphic markers is needed to improve our knowledge of parasite transmission pathways in Iran.

The Tehran University of Medical Sciences supported the Ph.D.-related training of A.R.M. in the Ecology of Parasitism Department at the Lille Pasteur Institute (Lille, France). The French Ministry of Research (quadrennial EA3609-Lille 2 University contract) supported this work.

We thank T. Ngouanesavanh for her generous and enthusiastic cooperation.

REFERENCES

- Ahourai, P., A. Ezzi, M. R. Gholami, J. Vandyoosefi, R. Kargar, and N. Maalagh. 1985. *Cryptosporidium* spp. in new born lambs in Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* 17:6–8.
- Alves, M., L. Xiao, I. Sulaiman, A. A. Lal, O. Matos, and F. Antunes. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41:2744–2747.
- Caccio, S. M. 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitologia* 47:185–192.
- Chalmers, R. M., K. Elwin, A. L. Thomas, and D. H. Joynton. 2002. Infection with unusual types of *Cryptosporidium* is not restricted to immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.* 185:270–271.
- Fayer, R., M. Santin, J. M. Trout, and E. Greiner. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135:105–112.
- Fayer, R., M. Santin, and L. Xiao. 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91:624–629.
- Gatei, W., J. Greensill, R. W. Ashford, L. E. Cuevas, C. M. Parry, N. A. Cunliffe, N. J. Beeching, and C. A. Hart. 2003. Molecular analysis of the 18S

- rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1458–1462.
8. Guyot, K., A. Follet-Dumoulin, E. Lelievre, C. Sarfati, M. Rabodonirina, G. Nevez, J. C. Cailliez, D. Camus, and E. Dei-Cas. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3472–3480.
 9. Guyot, K., A. Follet-Dumoulin, C. Recourt, E. Lelievre, J. C. Cailliez, and E. Dei-Cas. 2002. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2071–2076.
 10. Hamed, Y., O. Safa, and M. Haidari. 2005. *Cryptosporidium* infection in diarrheic children in southeastern Iran. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**:86–88.
 11. Leav, B. A., M. R. Mackay, A. Anyanwu, R. M. O'Connor, A. M. Cevallos, G. Kindra, N. C. Rollins, M. L. Bennish, R. G. Nelson, and H. D. Ward. 2002. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic *Cpgp40/15* locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect. Immun.* **70**:3881–3890.
 12. Mallon, M. E., A. MacLeod, J. M. Wastling, H. Smith, and A. Tait. 2003. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* type 2: population genetics and sub-structuring. *Infect. Genet. Evol.* **3**:207–218.
 13. McLauchlin, J., C. Amar, S. Pedraza-Diaz, and G. L. Nichols. 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3984–3990.
 14. Meamar, A. R., M. Rezaian, S. Rezaie, M. Mohraz, E. B. Kia, E. R. Houpt, and S. Solaymani-Mohammadi. 2006. *Cryptosporidium parvum* bovine genotype oocysts in the respiratory samples of an AIDS patient: efficacy of treatment with a combination of azithromycin and paromomycin. *Parasitol. Res.* **98**:593–595.
 15. Muthusamy, D., S. S. Rao, S. Ramani, B. Monica, I. Banerjee, O. C. Abraham, D. C. Mathai, B. Primrose, J. Mulyil, C. A. Wanke, H. D. Ward, and G. Kang. 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J. Clin. Microbiol.* **44**:632–634.
 16. Ngouanesavanh, T., K. Guyot, G. Certad, Y. Le Fichoux, C. Chartier, R. I. Verdier, J. C. Cailliez, D. Camus, E. Dei-Cas, and A. L. Banuls. 2006. *Cryptosporidium* population genetics: evidence of clonality in isolates from France and Haiti. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53**:533–536.
 17. Nouri, M., and R. Toroghi. 1991. Asymptomatic cryptosporidiosis in cattle and humans in Iran. *Vet. Rec.* **128**:358–359.
 18. Peng, M. M., S. R. Meshnick, N. A. Cunliffe, B. D. Thindwa, C. A. Hart, R. L. Broadhead, and L. Xiao. 2003. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**(Suppl.):557–559.
 19. Samic, A., P. O. Bessong, C. L. Obi, J. E. Sevilleja, S. Stroup, E. Houpt, and R. L. Guerrant. 2006. *Cryptosporidium* species: preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. *Exp. Parasitol.* **114**:314–322.
 20. Santin, M., J. M. Trout, L. Xiao, L. Zhou, E. Greiner, and R. Fayer. 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* **122**:103–117.
 21. Sulaiman, I. M., P. R. Hira, L. Zhou, F. M. Al-Ali, F. A. Al-Shelahi, H. M. Shweiki, J. Iqbal, N. Khalid, and L. Xiao. 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2805–2809.
 22. Sunnotel, O., C. J. Lowery, J. E. Moore, J. S. Dooley, L. Xiao, B. C. Millar, P. J. Rooney, and W. J. Snelling. 2006. *Cryptosporidium*. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**:7–16.
 23. Tiangtip, R., and S. Jongwutives. 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* **7**:357–364.
 24. Tumwine, J. K., A. Kekitiinwa, N. Nabukeera, D. E. Akiyoshi, S. M. Rich, G. Widmer, X. Feng, and S. Tzipori. 2003. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**:710–715.
 25. Xiao, L., C. Bern, J. Limor, I. Sulaiman, J. Roberts, W. Checkley, L. Cabrera, R. H. Gilman, and A. A. Lal. 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* **183**:492–497.
 26. Xiao, L., L. Escalante, C. Yang, I. Sulaiman, A. A. Escalante, R. J. Montali, R. Fayer, and A. A. Lal. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1578–1583.
 27. Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan, and S. J. Upton. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:72–97.
 28. Xiao, L., U. M. Morgan, J. Limor, A. Escalante, M. Arrowood, W. Shulaw, R. C. Thompson, R. Fayer, and A. A. Lal. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3386–3391.
 29. Zali, M. R., A. J. Mehr, M. Rezaian, A. R. Meamar, S. Vaziri, and M. Mohraz. 2004. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**:268–270.

2. UNE DECOUVERTE : L'INDUCTION DE NEOPLASIE GASTRO-INTESTINALE PAR *C. PARVUM*

2.1. SOURIS SCID SOUS DEXAMETHASONE : ETUDE DE LESIONS HISTOLOGIQUES ASSOCIEES A L'INFECTION PAR *C. PARVUM*

2.1.1. Article 5.

« *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic Adenocarcinoma” (article publié dans *Infectious Agents and Cancer*, 2007, 2 :22 doi : 10.1186/1750-9378-2-22)

Dans ce travail, nous avons mis au point un modèle murin reproductible et fiable, avec comme objectif premier de faciliter l'étude approfondie de la cryptosporidiose, mais qui nous a révélé de façon surprenante l'implication de *C. parvum* dans un processus néoplasique digestif. Devant l'importance de ce résultat, nous lui avons consacré le second axe de notre travail, auquel fait suite un travail de synthèse sur la susceptibilité de notre modèle aux différentes espèces de *Cryptosporidium* présenté en dernière partie.

Des souris SCID soumises ou pas à la Dex ont été infectés par voie orale avec *C. parvum* (Iowa) ou avec *C. muris* (RN66). Les paramètres évalués étaient la sensibilité du modèle aux deux espèces, les périodes prépatentes et patentes, l'intensité et la durée de l'infection, et les sites de colonisation du tractus gastro-intestinale. Dans l'article N° 7 les observations parasitologiques sont rapportées en détail.

Le résultat, entièrement inattendu, le plus marquant de ce travail a été la découverte, chez les souris SCID traitées avec la Dex et inoculées avec 10⁵ oocystes de *C. parvum* des dysplasies ou néoplasies intramuqueuse iléo-caecales voire des adénocarcinomes *in situ*, à partir du 46^e jour post-inoculation. Voici les détails de ces résultats :

1. L'étude histopathologique a confirmé la localisation gastrique de *C. muris* et en a révélé une colonisation préférentiellement fundique.
2. *C. parvum* était retrouvé principalement dans la région iléo-caecale.

3. Chez 100 % des souris traitées à la Dex et euthanasiées à partir du 46^e jour post-infection, *C. parvum* était associée à un néoplasie intra-muqueuse de bas ou de haut grade selon la classification de tumeurs de rongeurs (Boivin *et al.*, 2003), ou à la présence d'un adénocarcinome intra-muqueux selon la classification de tumeurs gastro-intestinales chez l'homme (Stolte, 2003; Scoazec, 2007).
4. Les lésions néoplasiques étaient associées dans tous les cas à la présence de stades intracellulaires de *C. parvum*.
5. Les souris SCID infectées par *C. muris* n'ont pas développé des lésions néoplasiques.

Pour éliminer une autre possible cause de néoplasie les contrôles suivants ont été ajoutés dans les expériences successives:

1. Des souris SCID soumises ou pas au traitement par la Dex inoculées par voie orale avec l'inoculum filtré (filtre 0.45µm), sans oocystes, donc, et entretenues dans les mêmes conditions et dans le même isolateur que les autres animaux.
2. Des souris SCID soumises ou pas au traitement par la Dex inoculées par voie orale avec du tampon phosphate et entretenues dans les mêmes conditions et dans le même isolateur que les autres animaux.
3. Des souris SCID intactes entretenues dans les mêmes conditions et dans le même isolateur que les autres animaux.

Les contrôles (1), (2) et (3) n'ont pas montré de cryptosporidiose (examen microscopique et PCR négatifs) ni des lésions néoplasiques ou autres (histologie digestive normale).

En somme, ces expériences montrent que *C. parvum* souche Iowa, est capable d'induire un processus néoplasique intra-épithélial de haut grade chez la souris SCID, que cet effet est lié à l'espèce parasitaire (car *C. muris* n'a pas induit ce processus dans nos conditions de travail) et probablement au degré d'immunodépression. Nous ne savons pas si ce processus, resté *in situ* dans la durée de nos expériences, peut devenir invasif dans des périodes plus prolongées.

***Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma**

Gabriela Certad*^{†1,2}, Tramy Ngouanesavanh^{†1}, Karine Guyot¹,
Nausicaa Gantois¹, Thierry Chassat³, Anthony Mouray³, Laurence Fleurisse⁴,
Anthony Pinon⁵, Jean-Charles Cailliez⁶, Eduardo Dei-Cas^{1,7} and
Colette Creusy⁴

Address: ¹Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, France, ²Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela, ³Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, France, ⁴Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille, France, ⁵Unité de Sécurité Microbiologique, Institut Pasteur de Lille, France, ⁶Laboratoire Environnement et Santé, Université Catholique de Lille, France and ⁷Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, France

Email: Gabriela Certad* - gabriela.certad@pasteur-lille.fr; Tramy Ngouanesavanh - ndn.tramy@gmail.com;
Karine Guyot - karine.guyot@pasteur-lille.fr; Nausicaa Gantois - nausicaa.gantois@pasteur-lille.fr; Thierry Chassat - thierry.chassat@pasteur-lille.fr; Anthony Mouray - anthony.mouray@pasteur-lille.fr; Laurence Fleurisse - lfleurisse@yahoo.fr; Anthony Pinon - anthony.pinon@pasteur-lille.fr; Jean-Charles Cailliez - jean-charles.cailliez@icl-lille.fr; Eduardo Dei-Cas - eduardo.dei-cas@pasteur-lille.fr;
Colette Creusy - cceusy@nordnet.fr

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 21 November 2007

Received: 2 July 2007

Infectious Agents and Cancer 2007, **2**:22 doi:10.1186/1750-9378-2-22

Accepted: 21 November 2007

This article is available from: <http://www.infectagentscancer.com/content/2/1/22>

© 2007 Certad et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Cryptosporidiosis represents a major public health problem. This infection has been reported worldwide as a frequent cause of diarrhoea. Particularly, it remains a clinically significant opportunistic infection among immunocompromised patients, causing potentially life-threatening diarrhoea in HIV-infected persons. However, the understanding about different aspects of this infection such as invasion, transmission and pathogenesis is problematic. Additionally, it has been difficult to find suitable animal models for propagation of this parasite. Efforts are needed to develop reproducible animal models allowing both the routine passage of different species and approaching unclear aspects of *Cryptosporidium* infection, especially in the pathophysiology field.

Results: We developed a model using adult severe combined immunodeficiency (SCID) mice inoculated with *Cryptosporidium parvum* or *Cryptosporidium muris* while treated or not with Dexamethasone (Dex) in order to investigate divergences in prepatent period, oocyst shedding or clinical and histopathological manifestations. *C. muris*-infected mice showed high levels of oocysts excretion, whatever the chemical immunosuppression status. Pre-patent periods were 11 days and 9.7 days in average in Dex treated and untreated mice, respectively. Parasite infection was restricted to the stomach, and had a clear preferential colonization for fundic area in both groups. Among *C. parvum*-infected mice, Dex-treated SCID mice became chronic shedders with a prepatent period of 6.2 days in average. *C. parvum*-inoculated mice treated with Dex developed glandular cystic polyps with areas of intraepithelial neoplasia, and also with the presence of intramucosal adenocarcinoma.

Conclusion: For the first time *C. parvum* is associated with the formation of polyps and adenocarcinoma lesions in the gut of Dex-treated SCID mice. Additionally, we have developed a model to compare chronic *muris* and *parvum* cryptosporidiosis using SCID mice treated with corticoids. This reproducible model has facilitated the evaluation of clinical signs, oocyst shedding, location of the infection, pathogenicity, and histopathological changes in the gastrointestinal tract, indicating divergent effects of Dex according to *Cryptosporidium* species causing infection.

Background

Cryptosporidiosis represents a major public health problem. This infection, caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*, has been reported worldwide as a frequent cause of diarrhoea, and its prevalence varies according to different regions [1]. In developed countries, massive *Cryptosporidium* foodborne and waterborne outbreaks have been reported. In developing countries, *Cryptosporidium* affects mostly children under five [2]. Furthermore, cryptosporidiosis remains a clinically significant opportunistic infection in immunocompromised patients, causing potentially life-threatening diarrhoea, especially in those HIV-infected without access to highly active antiretroviral therapy (HAART) [3]. Additionally, these parasites not only infect humans, but also cause morbidity in farm animals, leading to economic losses [4]. Most *Cryptosporidium* species infect the epithelium of the gut but in severe infections, dissemination can occur to extra-intestinal sites [5]. Infection of the intestinal cells can result in blunting of the intestinal villi, crypt hyperplasia and inflammation. Epithelial cell apoptosis due to this parasite has also been described [6,7].

Molecular techniques have been developed to differentiate this parasite at the species and genotype levels, showing that there are at least 16 different species [1], and several methods have been used to study and characterize different parasite strains. However, the understanding about invasion, transmission, pathogenesis and epidemiology is limited, and no effective drug against this infection is available. Previous studies based on multilocus characterisation of *Cryptosporidium* isolates identified different sub-groups within some *Cryptosporidium* species [8-11]. These groups exhibited different population genetic structures (epidemic clonality and panmixia) that could be correlated to defined phenotypes.

To contribute to the comprehension of the dynamics of infection and to investigate biological divergence between different populations of *Cryptosporidium*, tissue culture and animal models have been used. It has been difficult to find suitable models for cryptosporidiosis, as most mammals are susceptible to infection only as newborns [12]. However, some *Cryptosporidium* species can be propagated in either chemically or genetically immunosuppressed mice. Particularly, adult mice with congenital mutations such as *nu/nu*, *scid*, *bg/nu*, *xid* or mice with steroid induced immunosuppression are susceptible to infection [12-17]. Efforts are still needed to develop reproducible animal models allowing both the routine passage of different species and approaching unclear aspects of *Cryptosporidium* infection, especially in the pathophysiology field.

We have developed a model to compare chronic *muris* and *parvum* cryptosporidiosis using SCID mice treated with corticoids in order to evaluate clinical signs, location of the infection, pathogenicity, oocyst shedding and histopathological changes in the gastrointestinal tract. This model was chosen for the following reasons: i) Previous studies have shown that host cell immunity during cryptosporidiosis is mediated by both Th1 and Th2 response [18,19], thus SCID mice are more susceptible to the infection and to develop a chronic disease due to their defect in T and B lymphocytes [20]. ii) It has been found that during cryptosporidiosis there is an IFN γ mucosal response with increased levels of IL15 [21]. IFN γ -induced enterocyte resistance against *C. parvum* has been reported [22]. Furthermore, glucocorticoids are known to have an effect on the priming of the innate immune response [23], and could suppress IFN γ -regulated gene expression [24]. Consequently, dexamethasone, a synthetic glucocorticosteroid, could be used to alter this innate immune response. iii) This model of SCID mice treated with steroids has been proven to be successful for the development of *Pneumocystis*, another opportunistic agent [25].

Results

The pathological damage due to *C. muris* or *C. parvum* infection was studied in SCID mice treated or not with Dex. Main data related to infected mice included in the study are shown in Table 1.

Dex induced a significant body weight loss in both *Cryptosporidium* infected and uninfected SCID mice ($P < 0.001$). In contrast, no significant body weight change was associated with parasite infection. Once infected with *C. muris*, mice from groups M and MDex became chronic shedders and produced high numbers of oocysts without marked differences between the groups. On the other hand, in animals inoculated with *C. parvum*, the oocyst excretion was sporadic and limited in P mice, and high and chronic in PDex mice, with a statistically significant difference ($P = 0.002$). Figure 1 shows the average of oocyst excretion in different groups of mice. Analysis of variance showed that the administration of Dex, *Cryptosporidium* species, and the interaction of these factors significantly influenced oocyst excretion (all the $P < 0.001$). The level of oocyst excretion was higher in mice infected with *C. muris* than in those infected with *C. parvum*.

Pre-patent period ranged from 6 to 11 days (9.7 days in average) in M mice and it was 11 days for all MDex mice. Geometric means of oocyst excretion before sacrifice were 1839 and 1159 oocysts/mg faeces respectively (Table 1). At histological level, no difference between mice of groups M or MDex was observed. *C. muris* localization was restricted to the stomach, with no extra-gastric dissemination. Different stages of the parasite life cycle were present.

Table 1: Experimental infection of Dexamethasone-treated or untreated SCID mice infected with *C. parvum* or *C. muris*: Main clinical and histopathological data

Group ^a	Mouse N ^o	Day of euthanasia (post-infection)	Oocysts/mg faeces at euthanasia	Clinical manifestations	Main histological changes	
P	1	20	0	Occasional diarrhoea	Undetected	
	2	28	0	Lethargy	Undetected	
	3	28	1	None	N.D.	
	4	84	1	Occasional diarrhoea	Undetected	
	5	84	4	Occasional diarrhoea	Undetected	
	6	84	0	Occasional diarrhoea	N.D.	
Pdex	7	20	29	Occasional diarrhoea	Undetected	
	8	28	102	Lethargy, ruffled coat	Undetected	
	9	28	95	Lethargy, ruffled coat	N.D.	
	10	46	1182	Lethargy, ruffled coat	Polyps with areas of low-grade and high-grade intraepithelial neoplasia, and intramucosal adenocarcinoma at the ileocaecal region	
	11	62	240	Lethargy, ruffled coat	Polyps with areas of low-grade and high-grade intraepithelial neoplasia, and intramucosal adenocarcinoma at the ileocaecal region	
	12	84	695	Lethargy, ruffled coat	Polyps with areas of low-grade and high-grade intraepithelial neoplasia, and intramucosal adenocarcinoma at the ileocaecal region	
M	13	20	1078	None	Stomach heavily infected mainly at the fundic region; dilated glands; hyperplasia	
	14	20	407	None	N.D.	
	15	28	742	None	Stomach heavily infected mainly at the fundic glands; hyperplasia	
	16	84	4143	None	Stomach heavily infected mainly at the fundic region; dilated glands; hyperplasia	
	17	84	4920	None	Stomach heavily infected	
	18	84	5828	None	None	
	Mdex	19	20	1538	Occasional diarrhoea	Stomach heavily infected; dilated glands
		20	20	166	Occasional diarrhoea	N.D.
21		27	1241	Occasional diarrhoea	N.D.	
22		32	4155	Frequent diarrhoea, lethargy, ruffled coat	Stomach heavily infected mainly at the fundic glands; hyperplasia	
23		46	900	Lethargy, ruffled coat	Stomach heavily infected mainly at the fundic glands; hyperplasia	
24		84	2051	None	Stomach heavily infected mainly at the fundic glands; hyperplasia; a little inflammation	
C	25	20	0	None	Undetected	
	26	67	0	Lethargy, ruffled coat	Undetected	
	27	84	0	None	Undetected	
Cdex	28	20	0	None	Undetected	
	29	43	0	None	Undetected	
	30	84	0	None	Undetected	
Cdex2	31	54	0	None	Undetected	
	32	54	0	None	Undetected	
	33	54	0	None	Undetected	
	34	54	0	None	Undetected	
	35	54	0	None	Undetected	
	36	54	0	None	Undetected	

^aExperimental groups were:

P: *C. parvum*-infected SCID mice; **Pdex:** *C. parvum*-infected Dex-treated SCID mice; **M:** *C. muris*-infected SCID mice; **Mdex:** *C. muris*-infected Dex-treated SCID mice; **C:** Not infected SCID mice of control group inoculated with PBS; **Cdex:** Not infected Dex-treated SCID mice of control group inoculated with PBS; **Cdex2:** Not infected Dex-treated SCID mice that received an inoculum from which oocysts were previously removed by filtration; **N.D.:** Not done (These mice were not included in the histological examination).

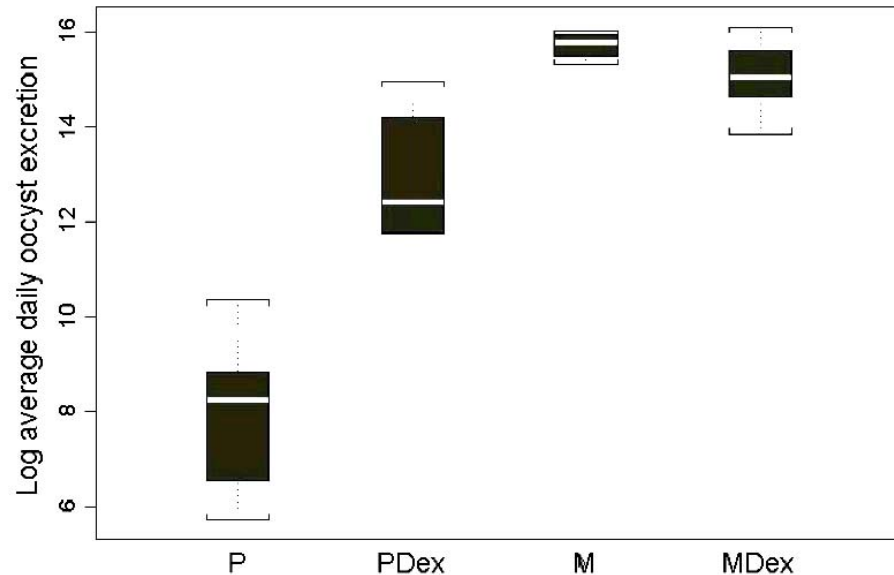


Figure 1
Napierian logarithm of daily oocyst excretion (oocyst/mg faeces) in different groups of mice. Experimental groups were: P: *C. parvum*-infected SCID mice; PDex: *C. parvum*-infected Dex-treated SCID mice; M: *C. muris*-infected SCID mice; MDex: *C. muris*-infected Dex-treated SCID mice. Each box represents the middle half of data, the white line being the median. Whiskers represent the extreme values within 1.5 times the box height.

Stomachs of all mice euthanized at different dates, from day 20 to day 84 post-infection, were heavily infected mainly in fundic mucosae (Figure 2). Fundic gastric glands were dilated and covered by a flattened epithelium. Oxyntic cells were less numerous than in control mice and preferentially visible in the deeper area. Fundic mucosa was twice thinner than in control mice while pyloric mucosa was similar to that in uninfected control mice. A moderate inflammatory infiltrate, made of mononuclear cells and neutrophilic polynuclears, was observed in some cases.

For *C. parvum*-infected SCID mice from group P, geometric mean of oocyst excretion before euthanasia was 1 oocyst/mg faeces. SCID mice from PDex group had a prepatent period ranging from 4 to 11 days (6.2 days in average) and developed a chronic infection. Geometric mean of oocyst excretion before sacrifice was 195 oocysts/mg of faeces for mice from group PDex. Two out of six PDex SCID mice were severely ill and required euthanasia. In mice infected with *C. parvum*, histopathological differences were revealed between Dex-treated and untreated animals. Untreated SCID mice infected with *C. parvum* have neither detectable parasites nor lesions at the histo-

logical level (Figure 3) at any time during the course of the study.

In Dex-treated SCID mice infected with *C. parvum*, parasite localization was restricted to the gastrointestinal tract, mainly at the caecal region (Figure 3). Three out of five (60%) histologically examined PDex SCID mice presented in the ileocaecal region polypoid, sessile, adenomatous masses, measuring approximately 2.5 mm in diameter. They appeared as closely packed, branching sometimes dilated tubular structures, separated by normal or inflammatory lamina propria. Focal cystic dilation was observed. Noticeably some tubules were covered by a low grade or high grade dysplastic epithelium, which showed mucin depletion and nuclear stratification. In some areas, architectural distortion was associated with marked cellular atypias (Figure 4). Epithelial cells presented a loss of their normal polarity. In addition, abnormal nuclear changes consisting of prominent nucleoli and irregularly scattered chromatin were observed (Figure 4). These mucosal changes were suggestive of intraepithelial neoplasia of low or high grade. In some areas, major cellular atypias, with foci of merged glands, typical of intramucosal adenocarcinoma, invasive into lamina propria, were found (Figures 4A and 4B).

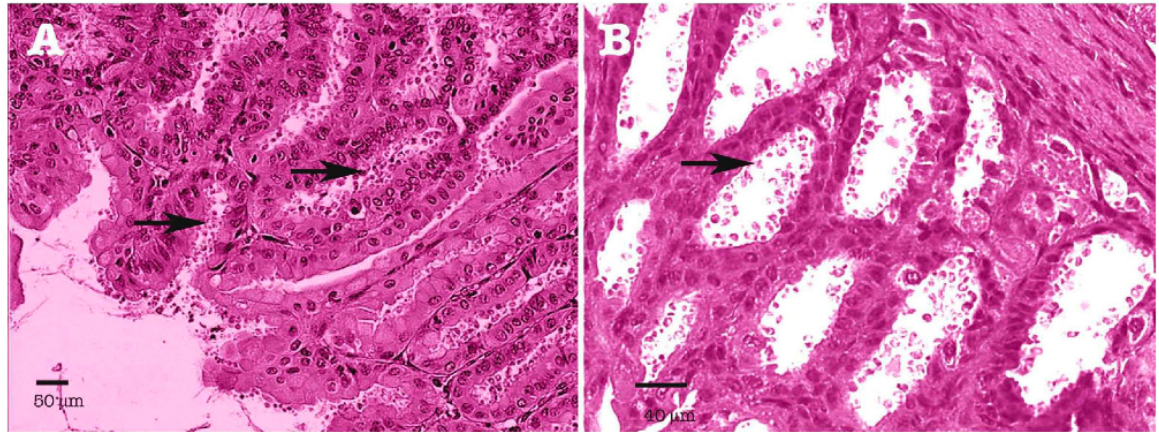


Figure 2

Experimental *Cryptosporidium muris* infection of SCID mice. (A) Stomach section from a Dex-untreated SCID mouse euthanized at day 84 post-infection; (B) Stomach section from a Dex-treated SCID mouse euthanized at day 46 post-infection. In both cases, gastric glands are filled with numerous parasites at different developmental stages (arrows). No signs of inflammation. Hematoxylin & Eosin staining.

These major histological changes were earliest observed in one mouse euthanized at day 46 post-infection and were found in all PDex mice necropsied after (Table 1). They were always associated with the presence of *C. parvum* organisms (Figures 4 and 5). In contrast, no parasite was detected in the stomach, duodenum, jejunum, hepatic biliary system or pancreas. The possibility that biotic (e.g. virus) or abiotic factors present in the inoculum could be responsible for these lesions was discarded by administering Dex-treated SCID mice with a filtered inoculum (i.e. without *Cryptosporidium* oocysts) (group Cdex2). Neither parasites in the faeces or tissues nor lesions were detected in these mice at any time of the experience.

Discussion

We developed a new animal model that allows a good propagation of two different species of *Cryptosporidium*. In this study, adult SCID mice treated with Dex became chronically infected with 10^5 *C. parvum* or *C. muris* oocysts, and had a significant oocyst shedding during all the course of the experiments. Furthermore, this model was useful to compare *C. muris* and *C. parvum* infections at clinical, histopathological and parasitological levels.

In this study, variations in the expression of the disease in terms of either *Cryptosporidium* species or Dex administration were shown. Amounts of oocysts discharged seemed slightly lower in MDex than in M mice but this difference was not statistically significant. However, it appeared that the aggravation of the immunosuppression status did not

lead to an increase in the severity of *C. muris* infection. Miller *et al.* previously reported that immunosuppressed mice were as or less susceptible to *C. muris* than immunocompetent mice [26]. However, this conclusion can hardly be extrapolated to all *Cryptosporidium* species, as long as in our experiments, the oocyst shedding was markedly and significantly higher in PDex than in P group. Further studies are required to determine minimal infectious dose, ID₅₀ (infectious dose to 50 percent of exposed individuals) and other data for each species and according to the immunosuppression degree. Interestingly, data from very recent experiments with *C. parvum* confirmed the results of the present work (data not shown). The Dex-treated SCID mouse model revealed therefore to be reproducible.

C. muris infection caused damage to the gastric mucosa of both mice from M and MDex groups. But though M mice were less ill than MDex mice, there was no marked histological difference between them. Dilated, hypertrophied and highly parasitized gastric glands without an extra gastric dissemination of parasites were the main histopathological changes. Additionally, a little inflammatory response was observed. Other authors have reported similar findings in relation with *C. muris* gastric infection [12,27,28]. However, to our knowledge, this is the first report of a clear preferential localization of the parasite colonization at the fundic level of the stomach, where acid secreting glands are numerous [29]. This could suggest a favourable influence of lower gastric pH on the growth of *C. muris*.

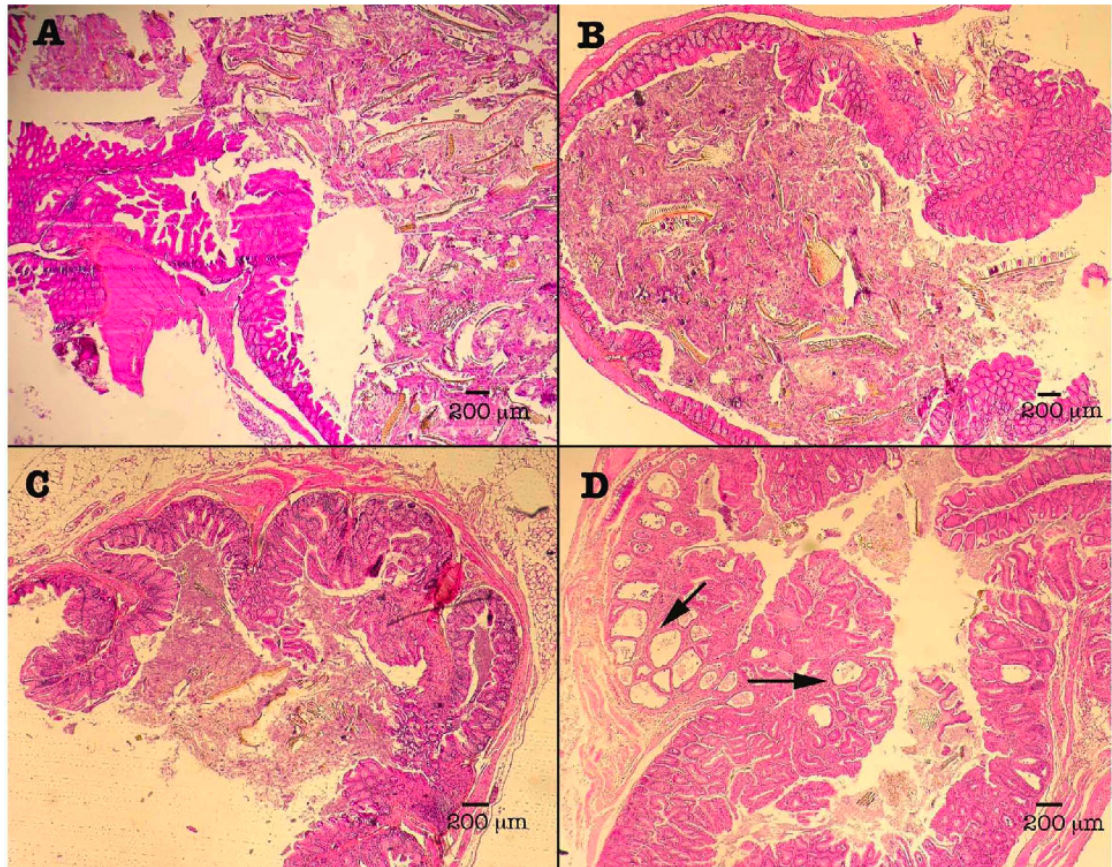


Figure 3
Ileocaecal regions of mice from different groups. Normal caecum of (A) Uninfected mouse administered with dexamethasone (CDex group), (B) *C. muris*-infected Dex-treated mouse (MD group) and (C) *C. parvum*-infected mouse (P group). (D) Projection of polypoid structures with focal cystic dilation (arrows) developing inside the intestinal lumen of a *C. parvum*-infected Dex-treated SCID mouse. Hematoxylin & Eosin staining.

On the other hand, several studies using animal models have described histological changes in the intestinal epithelium due to *C. parvum* infection, such as villous atrophy and crypt hyperplasia in the lower small intestine [13] or in the caecum and the colon [12], cryptic hyperplasia with abscesation of crypts in the large intestine [13], stunting and fusion of villi, replacement of enterocytes by immature cells and eosinophilia of lamina propria [30], small and large intestine mucosa severely damaged with villous contraction and little or absent epithelial layer [31]. Another report described an association between *Cryptosporidium* sp. and aural-pharyngeal polyps in iguanas. These polyps were pedunculated masses composed of glandular cystic structures lined by hyperplastic cuboidal to columnar epithelium, containing numerous parasites

along the apical surfaces of the epithelial cells [32]. Nevertheless, none of these studies have described the presence of carcinoma lesions associated to cryptosporidiosis. These lesions were first observed unexpectedly after 46 days post-infection, when the infection had become chronic, and were found only in *C. parvum* infected SCID mice treated with Dex. These findings were recorded using an inoculum relatively low (10^5 oocysts) in comparison with the higher infectious doses, between 10^6 and 10^7 , used by others [12,33].

Several observations in our study suggest that combination of *C. parvum* with Dex administration is involved in the generation of these significant histological changes. Indeed, Dex seemed to be a critical factor to the develop-

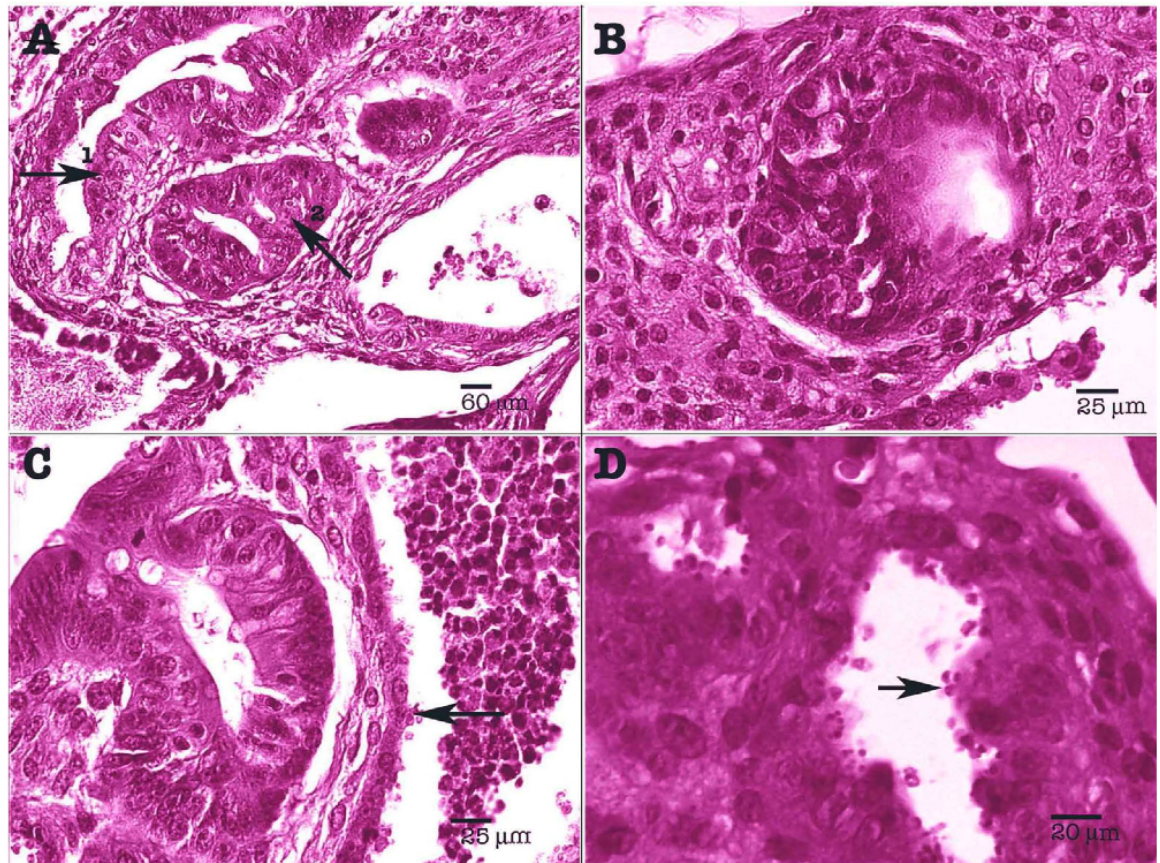


Figure 4
Experimental *Cryptosporidium parvum* infection of Dex-treated SCID mice: caecal region. (A) Polyp with areas of high-grade intraepithelial neoplasia (arrow 1) and intramucosal adenocarcinoma (arrow 2); (B) Abnormal nuclear changes consisting of prominent nucleoli and irregularly scattered chromatin; (C) Highly irregular glands, areas of loss of glandular differentiation. Presence of numerous parasites (arrow); (D) Presence of numerous parasites at different developmental stages in the intestinal epithelium (arrow). Hematoxylin & Eosin staining.

ment of intraepithelial adenocarcinoma in *C. parvum*-infected SCID mice. Dex potentially alters the innate immunity in *C. parvum* infected animals [23,24]. The higher oocyst shedding found in mice presenting these neoplastic lesions seems to confirm this assumption. Additionally, this kind of lesion was found neither in Dex-untreated *C. parvum*-infected animals with a low oocyst excretion during the course of the study, nor in the control Dex-treated non-infected group. A possible contamination of the inoculum with a virus or other agent potentially responsible for these neoplastic lesions was also discarded. Interestingly, *C. muris* was not able to induce this type of epithelial changes and the reasons of this different expression of the disease are unclear. It has been

reported previously a variability in pathogenicity for different hosts between different *Cryptosporidium* species and types, suggesting the existence of specific virulence factors among species and isolates [34]. Further studies should be done to clarify this difference in pathogenicity. It is important to mention that these colonic neoplastic lesions are not listed among the typical background diseases due to the SCID mice genetic defect [35].

To our knowledge, this is the first time that *C. parvum* is associated with cancerogenesis. There is one case report that described cryptosporidiosis of the biliary tract clinically mimicking a pancreatic cancer in an AIDS patient [36]. However, biopsy of the gallbladder revealed crypt-

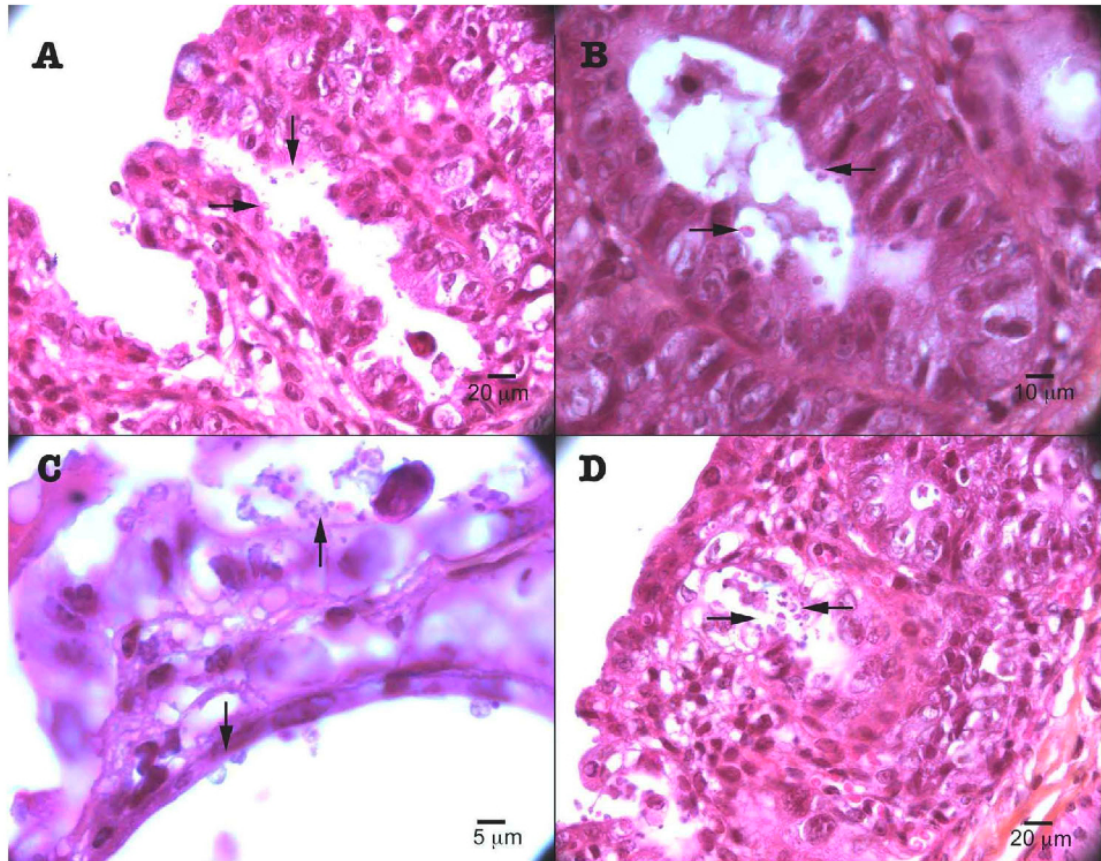


Figure 5
Experimental *Cryptosporidium parvum* infection of Dex-treated SCID mice. Low (A, D) and high magnification (B, C) of the caecal region showing the presence of abundant parasites (arrow), and high degree dysplasia (arrow). Hematoxylin & Eosin staining.

osporidiosis causing inflammation of the biliary tract and ruled out the diagnosis of neoplasia [36]. Furthermore, a recent epidemiological study in Poland reported a high frequency of cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer [37]. These data strengthen the interest of our experimental observations.

Several infectious agents, including parasites, have been linked to oncogenesis in humans. Some of these associations are strong. Particularly, *Schistosoma hematobium* has been described as a definitive cause of urinary bladder cancer by the International Agency for Research in Cancer. Also, a proportion of cholangiocarcinoma of the liver worldwide is attributable to Opisthorchiidae liver flukes [38]. Other associations still speculative with some protozoa were suggested on the basis of epidemiological obser-

vations, such as *Trichomona vaginalis* and cervical cancer, or *Toxoplasma gondii* and tumors [39]. As well, a microbial pathogen such as *Helicobacter pylori* has been classified as oncogenic for humans due to its strong epidemiological association with carcinoma of stomach and gastric lymphoma [38,40].

Because *C. parvum* is an opportunistic agent that causes significant morbidity and mortality in immunocompromised patients, it is possible that individuals infected with this parasite may have a higher risk of developing colorectal malignancies, especially when immunosuppression is more severe. In a retrospective study that shows the incidence and clinical course of colorectal malignancies in HIV/AIDS patients, adenocarcinoma was the type of cancer most frequently found among them. These patients

did not have familial antecedents of intestinal malignancies or other risk factors, and developed tumors at earlier ages in comparison to immunocompetent persons [41]. Unfortunately, no data about gastro-intestinal parasites in these patients were given in the study [41]. More studies have to be done in humans to evaluate cryptosporidiosis as a possible risk factor of colorectal cancer.

Epidemiological studies have shown that environmental factors may play a role in colon cancer susceptibility [42]. The association between chronic inflammation and cancer is also well known [43]. Particularly, colon cancer has also been associated to inflammatory bowel disease. In the latter case, cancer develops after sustained gut inflammation. However, in the present work *C. parvum* infection was associated with only mild inflammation of the intestine as reported also by others [12].

Taking into consideration that the observations described herein were replicated in a second experiment (unpublished data), it can be concluded that *C. parvum* is able to induce the formation of polyps and carcinogenic lesions in the gut of Dex-treated SCID mice. However, more work has to be done to elucidate this interesting association and to further understand cryptosporidiosis pathogenesis.

Conclusion

In summary, for the first time *C. parvum* was associated with the generation of polyps and *in situ* adenocarcinoma in the gut of Dex-treated SCID mice. Additionally, we have developed a model to compare chronic *muris* and *parvum* cryptosporidiosis using SCID mice treated with corticoids. This reproducible model has allowed the evaluation of clinical impact, oocyst shedding, location of the infections, pathogenic power, and histopathological changes indicating divergent effects of Dex according to *Cryptosporidium* species.

Methods

Cryptosporidium oocysts

C. parvum IOWA and *C. muris* RN66 oocysts were purchased from Waterborne™, Inc. (New Orleans, Louisiana) and stored in shipping medium (Phosphate-buffered saline (PBS) with penicillin, streptomycin, gentamycin, amphotericin B and 0.01% Tween 20) at 4 °C until use. Oocyst viability before inoculation was determined by a trypsin-taurocholate excystation test [44] and absence of germs was assured by testing the oocyst suspensions on Plate Count Agar and on Sabouraud plates.

Animals

Nine week-old male and female CB17-SCID mice were obtained from a colony bred at the Pasteur Institute of Lille (France), and maintained under aseptic conditions in an isolator, with standard laboratory food for experi-

mental mice and water *ad libitum*. All cages, food, water and bedding were sterilized before use. Faecal pellets were collected from all mice before inoculation to ascertain the absence of pre-existing *Cryptosporidium* infection. The conditions for the care of laboratory animals stipulated in European guidelines (Council directives on the protection of animals for experimental and other scientific purposes. J. Off. Communautés Européennes, 86/609/EEC, 1986, December 18th, L358) were followed.

Immunosuppression

When needed (see the next section), SCID mice were chemically immunosuppressed by administering 4 mg/L of dexamethasone sodium phosphate (Dex) (Merck, Lyon, France) via the drinking water. Immunosuppression was started two weeks prior to inoculation and was maintained during the whole experimentation. Dex-added water was replaced three times a week.

Experimental design

Twenty-four SCID mice, housed individually (one-mouse-cage) in capped cages, were randomly divided into four groups: P, M, PDex and MDex, described hereinafter. Six SCID mice, housed by three, constituted two control groups, C and CDex. Oral inoculation was done with 10⁵ oocysts in 200 µl of PBS. Six mice were infected with *C. parvum* oocysts (group P) and six others with *C. muris* oocysts (group M). Under the effect of Dex immunosuppression, six mice were infected with *C. parvum* oocysts (group PDex) and six others with *C. muris* oocysts (group MDex). Mice of control groups were inoculated only with PBS, without (group C) or with (group CDex) Dex administration. A further control group was constituted by six SCID mice that received an inoculum from which oocysts were previously removed by filtration with a Nanosep MF tube with a 0.45 µm pore size membrane (group CDex2).

Quantification of the oocyst shedding

To evaluate the intensity of oocyst shedding over the course of *Cryptosporidium* infection, freshly excreted faecal pellets were collected three times a week from each mouse and suspended in MilliQ water. Oocysts were detected and numbered after staining faecal smears with modified Ziehl-Neelsen stain [45].

Statistical analysis

Analyses of data were performed with the statistical software S-PLUS 2000 (MathSoft, Seattle, WA, USA). For statistical analyse purposes, logarithmic transformations of oocyst excretion values were used. Wilcoxon rank sum tests were used to compare body weights or oocyst excretion. An analysis of variance was conducted to account for the effects of relevant factors and their interactions on average daily excretion of oocysts. An average amount of oocysts excreted per day was estimated for each mouse

from all the unitary values, and was represented as a function of the mouse group in a Box & Whiskers Plot.

Histological examination

Periodically or when signs of imminent death appeared, mice were euthanized by a sodium pentobarbital (Ceva, Libourne, France) intra-cardiac injection. The liver, stomach and pancreas, a section of the duodenum, 3 sections of the jejunum, the caecum, and 3 sections of the colon were removed. Tissues were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin, and examined microscopically for the detection of *Cryptosporidium* organisms and/or histological modifications of the host tissue. Pathological changes found in the mouse caecum were classified according to the Vienna classification of tumors of the digestive system [46,47].

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GC & TN have equally contributed to this work. They participated in the conception and design of the study, carried out the experiments and drafted the manuscript. KG participated in the design of the experiments. NG, TC, AM participated in the performance of animal experiments. LF prepared the histological cuts. AP carried out the statistical analysis. ICC participated in the design of the study. ED participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. CC carried out the pathological study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Magali Chabé, Prof. El Moukhtar Aliouat, Dr. Dominique Leprince for their valuable advices and support, Nicolas Flament and Florent Le Broc for technical assistance. Precious points of view of Dr. Stephanos Papadopoulos and Prof. Pierre Gosset, pathologists, were very helpful for this work. This work received financial support from the Ministry of Research, France (EA3609), IFR 142 (Institut Pasteur de Lille), GIS Lille Genopole. G.C. was supported by a scholarship from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico of the Universidad Central de Venezuela. T.N. was supported by a French Ministry Research grant.

References

- Caccio SM, Pozio E: **Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006, **4**:429-443.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ: **Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health.** *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**:72-97.
- Pozio E, Morales MA: **The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites.** *Trends Parasitol* 2005, **21**:58-63.
- Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JS, Xiao L, Millar BC, Rooney PJ, Snelling WJ: **Cryptosporidium.** *Lett Appl Microbiol* 2006, **43**:7-16.
- Lopez-Velez R, Tarazona R, Garcia Camacho A, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V, Villanueva R: **Intestinal and extraintesti-**

- nal cryptosporidiosis in AIDS patients.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995, **14**:677-681.
- Chen XM, Levine SA, Splinter PL, Tietz PS, Ganong AL, Jobin C, Gores GJ, Paya CV, LaRusso NF: **Cryptosporidium parvum activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis.** *Gastroenterology* 2001, **120**:1774-1783.
- Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E: **Cryptosporidium parvum at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro.** *Infect Immun* 2004, **72**:6061-6067.
- Mallon M, MacLeod A, Wastling J, Smith H, Reilly B, Tait A: **Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen Cryptosporidium parvum.** *J Mol Evol* 2003, **56**:407-417.
- Alves M, Matos O, Antunes F: **Microsatellite analysis of Cryptosporidium hominis and C. parvum in Portugal: a preliminary study.** *J Eukaryot Microbiol* 2003, **50** Suppl:529-530.
- Tanriverdi S, Markovics A, Arslan MO, Itik A, Shkap V, Widmer G: **Emergence of distinct genotypes of Cryptosporidium parvum in structured host populations.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:2507-2513.
- Ngouanesavanh T, Guyot K, Certad G, Fichoux YL, Chartier C, Verdier RI, Cailliez JC, Camus D, Dei-Cas E, Banuls AL: **Cryptosporidium Population Genetics: Evidence of Clonality in Isolates from France and Haiti.** *J Eukaryot Microbiol* 2006, **53**:Suppl:S33-S36.
- McDonald V, Deer R, Uni S, Iseki M, Bancroft GJ: **Immune responses to Cryptosporidium muris and Cryptosporidium parvum in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice.** *Infect Immun* 1992, **60**:3325-3331.
- Heine J, Moon HW, Woodmansee DB: **Persistent Cryptosporidium infection in congenitally athymic (nude) mice.** *Infect Immun* 1984, **43**:856-859.
- Iseki M, Maekawa T, Moriya K, Uni S, Takada S: **Infectivity of Cryptosporidium muris (strain RN 66) in various laboratory animals.** *Parasitol Res* 1989, **75**:218-222.
- Mead JR, Arrowood MJ, Sidwell RW, Healey MC: **Chronic Cryptosporidium parvum infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice.** *J Infect Dis* 1991, **163**:1297-1304.
- Petry F, Robinson HA, McDonald V: **Murine infection model for maintenance and amplification of Cryptosporidium parvum oocysts.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**:1922-1924.
- Okhuysen PC, Rich SM, Chappell CL, Grimes KA, Widmer G, Feng X, Tzipori S: **Infectivity of a Cryptosporidium parvum isolate of cervine origin for healthy adults and interferon-gamma knock-out mice.** *J Infect Dis* 2002, **185**:1320-1325.
- Singh I, Theodos C, Li W, Tzipori S: **Kinetics of Cryptosporidium parvum-specific cytokine responses in healing and nonhealing murine models of C. parvum infection.** *Parasitol Res* 2005, **97**:309-317.
- Riggs MW: **Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response.** *Microbes Infect* 2002, **4**:1067-1080.
- Seydel KB, Stanley SL Jr.: **SCID mice and the study of parasitic disease.** *Clin Microbiol Rev* 1996, **9**:126-134.
- Robinson P, Okhuysen PC, Chappell CL, Lewis DE, Shahab I, Lahoti S, White AC Jr.: **Expression of IL-15 and IL-4 in IFN-gamma-independent control of experimental human Cryptosporidium parvum infection.** *Cytokine* 2001, **15**:39-46.
- Pollak RC, Farthing MJ, Bajaj-Elliott M, Sanderson IR, McDonald V: **Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen Cryptosporidium parvum.** *Gastroenterology* 2001, **120**:99-107.
- Franchimont D: **Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1024**:124-137.
- Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M: **Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation.** *J Biol Chem* 2007, **282**:4021-4034.
- Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, Durand-Joly I: **Immunocompetent hosts as a reservoir of Pneumocystis organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004, **23**:89-97.

26. Miller TA, Ware MW, Wymer LJ, Schaefer FW 3rd: **Chemically and genetically immunocompromised mice are not more susceptible than immunocompetent mice to infection with *Cryptosporidium muris*.** *Vet Parasitol* 2007, **143**:99-105.
27. Taylor MA, Marshall RN, Green JA, Catchpole J: **The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice.** *Vet Parasitol* 1999, **86**:41-48.
28. Miller TA, Schaefer FW 3rd: **Characterization of a *Cryptosporidium muris* infection and reinfection in CF-1 mice.** *Vet Parasitol* 2007, **144**:208-221.
29. Soybel DI: **Anatomy and physiology of the stomach.** *Surg Clin North Am* 2005, **85**:875-94, v.
30. Enemark HL, Bille-Hansen V, Lind P, Heegaard PM, Vigre H, Ahrens P, Thamsborg SM: **Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*—evaluation of an animal infection model.** *Vet Parasitol* 2003, **113**:35-57.
31. Tzipori S, Rand W, Griffiths J, Widmer G, Crabb J: **Evaluation of an animal model system for cryptosporidiosis: therapeutic efficacy of paromomycin and hyperimmune bovine colostrum-immunoglobulin.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1994, **1**:450-463.
32. Uhl EW, Jacobson E, Bartick TE, Micinilio J, Schimdt R: **Aural-pharyngeal polyps associated with *Cryptosporidium* infection in three iguanas (*Iguana iguana*).** *Vet Pathol* 2001, **38**:239-242.
33. Mead JR, Ilksoy N, You X, Belenkaya Y, Arrowood MJ, Fallon MT, Schinazi RF: **Infection dynamics and clinical features of cryptosporidiosis in SCID mice.** *Infect Immun* 1994, **62**:1691-1695.
34. Okhuysen PC, Chappell CL: ***Cryptosporidium* virulence determinants—are we there yet?** *Int J Parasitol* 2002, **32**:517-525.
35. Sundberg JP, Shultz LD: **The Severe Combined Immunodeficiency (scid) Mutation.** *JAX NOTES* 1993, **453**.
36. de Souza Ldo R, Rodrigues MA, Morcelli J, Kemp R, Mendes RP: **Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2004, **37**:182-185.
37. Sulzyc-Bielicka V, Kuzna-Grygiel W, Kolodziejczyk L, Bielicki D, Kladny J, Stepien-Korzonek M, Telatynska-Smieszek B: **Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer.** *J Parasitol* 2007, **93**:722-724.
38. Parkin DM: **The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002.** *Int J Cancer* 2006, **118**:3030-3044.
39. Khurana S, Dubey ML, Malla N: **Association of parasitic infections and cancers.** *Indian J Med Microbiol* 2005, **23**:74-79.
40. Fox JG, Wang TC: **Inflammation, atrophy, and gastric cancer.** *J Clin Invest* 2007, **117**:60-69.
41. Yeguez JF, Martinez SA, Sands DR, Sands LR, Hellinger MD: **Colorectal malignancies in HIV-positive patients.** *Am Surg* 2003, **69**:981-987.
42. Heyer J, Yang K, Lipkin M, Edelmann W, Kucherlapati R: **Mouse models for colorectal cancer.** *Oncogene* 1999, **18**:5325-5333.
43. Taketo MM: **Mouse models of gastrointestinal tumors.** *Cancer Sci* 2006, **97**:355-361.
44. Guyot K, Gireaudot-Liepmann MF, Cabon A, Riveau-Ricard I, Lange M, Delattre JM, Dei-Cas E: **Influence Of US Epa 1622 Method Successive Steps On The Viability Of *Cryptosporidium* Oocysts.** *Water Science & Technology* 2000, **41**:189-196.
45. Henriksen SA, Pohlenz JF: **Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique.** *Acta Vet Scand* 1981, **22**:594-596.
46. Hamilton SR, Aalfonen LA, eds.: **Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System. WHO classification of tumours.** Lyon, IARC Press; 2000:111.
47. Stolte M: **The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: advantages and disadvantages.** *Virchows Arch* 2003, **442**:99-106.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp


2.2. MODELE SOURIS SCID SOUS DEXAMETHASONE : EFFET DE LA TAILLE DE L'INOCULUM SUR LES LESIONS NEOPLASIQUES INDUITS PAR *C. PARVUM*

2.2.1 Article 6.

“Development of *Cryptosporidium parvum* Induced Gastro-Intestinal Neoplasia in SCID Mice: Severity of Lesions is Correlated with Infection Intensity” (article soumis à *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*)

Des souris SCID traitées avec Dex et inoculées avec 10^5 oocystes de *C. parvum* ont développé des néoplasie intraépithéliales iléo-caecales voire des adénocarcinomes *in situ* à partir du 46^e jour post-inoculation. Pour poursuivre nos travaux sur l'implication réelle de *C. parvum* dans le développement de ces lésions, une corrélation entre l'importance du processus néoplasique et le taux d'infection (évaluée principalement par le taux d'excrétion d'oocystes) a été recherchée. Les résultats suivants ont été obtenus :

Les résultats suivants ont été obtenus :

1. Nos résultats précédents ont été confirmés. Chez les souris SCID traitées avec Dex, les lésions histologiques observées ont révélé la présence de néoplasie intra-muqueuse de bas et de haut grade, voire d'adénocarcinome *in situ* dans le caecum, et ce type de lésion a été constaté aussi dans d'autres organes: l'estomac, le duodénum, et dans d'autres parties du côlon. En plus, 30% de ces souris présentaient des lésions dans plus d'un type d'organe.
2. Les souris infectées avec des inoculum plus chargés présentaient des lésions néoplasiques plus graves. Il existe donc une corrélation nette entre les taux de parasitisme et la sévérité des lésions.
3. Parmi les souris inoculées avec 10^5 et 10^6 oocystes et euthanasiées après le jour 46 post inoculation, la néoplasie intra-muqueuse de haut grade a été mis en évidence dans tous les animaux. Cette néoplasie était plus étendue chez les souris euthanasiées plus tardivement (au 46 puis au 57^{ème} jour post-infection).

4. Parmi 16 souris non traitées avec Dex et expérimentalement infectées avec *C. parvum* Iowa, 13 ont développé une inflammation hépatique péri-portale associée à la détection de parasites dans les canaux biliaires.
5. En plus des anomalies morphologiques, la présence effective de néoplasie dans l'estomac ou dans le caecum a été mesurée à l'aide du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67. Dans notre étude, le marqueur Ki-67 a confirmé la présence de prolifération cellulaire épithéliale dans la partie haute des glandes et le long de l'épithélium de surface. De plus, nos résultats avec ce marqueur ont montré que les modifications histopathologiques commençaient précocement, avant la visualisation des lésions typiques sur les préparations colorées à l'hématoxyline -éosine.

CERTAD AND OTHERS

CRYPTOSPORIDIUM INDUCED GASTRO-INTESTINAL NEOPLASIA

Development of *Cryptosporidium parvum* Induced Gastro-Intestinal Neoplasia in SCID Mice: Severity of Lesions is Correlated with Infection Intensity

Gabriela Certad*, Tramy Ngouanesavanh*, Karine Guyot, Nausicaa Gantois, Thierry Chassat, Anthony Mouray, Nicolas Flament, Laurence Fleurisse, Anthony Pinon, Laurence Delhaes, Eduardo Dei-Cas, and Colette Creusy

Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, France, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela, Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, France, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille, France, Unité de Sécurité Microbiologique, Institut Pasteur de Lille, France, Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, France

*These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

We reported previously that *Cryptosporidium parvum* was able to induce intestinal tumors in SCID mice treated with corticoids. To further characterize this *Cryptosporidium* induced cell transformation, SCID mice treated with Dexamethasone were challenged with different doses of *C. parvum* oocysts, and euthanatized sequentially after infection for histological examination. Ki-67 was used as a marker of cellular proliferation. Our previous results were confirmed, and it was also found that mice infected with higher inocula experienced more severe neoplastic development. Additionally, neoplastic changes were observed not only in the caecum but also in the stomach and duodenum of some animals. Interestingly, 100% of mice inoculated with 10^5 -- 10^7 oocysts and euthanatized after day 46 post-infection showed high grade intraepithelial neoplasia or adenomas with high grade dysplasia in the caecum. Immunohistochemistry for Ki-67 staining confirmed the neoplastic process associated to cryptosporidiosis, and showed that histopathological alterations begin very early.

KEY WORDS: *Cryptosporidium parvum*, cancer, gastric and colonic intraepithelial neoplasia, dysplasia, adenoma, SCID mice

INTRODUCTION

Cryptosporidium apicomplexa parasite known to be a causative agent of acute diarrhea in animals, has now emerged as one of the main agents of diarrhea in humans,¹ causing self limiting diarrhea in immunocompetent adults or life-threatening diarrhea in immune suppressed persons, particularly in AIDS (Acquired immune deficiency syndrome) patients.² Within the genus *Cryptosporidium*, many morphologically similar species has been reported, but with varying degrees of disease severity according to host susceptibility to infection and to diversity in isolate pathogenicity.³ Interestingly, *Cryptosporidium* species have been related to cancerogenesis. The association of cryptosporidiosis and colonic adenocarcinoma was speculated in the case of a Spanish patient carrying both, who died rapidly after the onset of symptoms.⁴ More recently, an epidemiological study in Poland reported a high frequency of cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer.⁵ However, in these reports it was unclear if *Cryptosporidium* sp behaved as a cancerogenesis factor or simply as an opportunistic agent whose development was enhanced by host immunosuppression. In the present work, we described the potential role of *Cryptosporidium parvum* in the development of colon neoplasia in experimentally infected severe combined immunodeficiency (SCID) mice treated with Dexamethasone.⁶ Herein, the ability of *C. parvum* to induce neoplastic changes could be established experimentally. In addition, we showed that deep immunosuppression alone did not entail neoplasia in uninfected hosts. Taking into account that *C. parvum* is able to modulate apoptosis of intestinal cells during its replication,⁷ a mechanism known to be involved in the cancerogenesis processes,⁸ and that SCID mice developed a chronic *C. parvum* infection with dose-dependent pathological effects,⁹ we further investigated *C. parvum* induced gastro-intestinal neoplasia using variable doses of *C. parvum* inocula and the cell proliferation marker Ki-67. This antigen is expressed in the nuclei of replicating cells being however rather related with neoplastic than with hyperplastic processes¹⁰.

MATERIALS AND METHODS

Overall study design and procedures. The study targeted the ability of different inoculum sizes of *C. parvum* oocysts to induce gastrointestinal neoplastic changes in dexamethasone-treated or –untreated SCID mice. Follow-up included oocyst shedding counts, histology, immunohistochemistry and assessing of the severity of lesions. SCID

mice have shown to be susceptible to *Cryptosporidium* infection and to develop chronic disease due to their defect in T and B lymphocytes but dexamethasone can also inhibit the priming of the innate immune response and IFN γ -regulated gene expression. Additionally, Aliouat *et al* (1997) showed that in SCID mice dexamethasone administration strongly expands *Pneumocystis* rates and increases the reproducibility of experiments¹¹. This effect maybe due to the reinforcement of the immunosuppression because it has been shown that while the majority of SCID mice lack functional lymphoid cells, approximately 15% of animals (leaky mice) can express detectable levels of immunoglobulins.

Animals and experimental design. Infective doses were prepared using *C. parvum* IOWA oocysts purchased from Waterborne TM, Inc. (New Orleans, Louisiana, USA) and were inoculated to seven week-old female CB17-SCID mice obtained from a colony bred at Pasteur Institute of Lille (France). Oocyst viability before inoculation was determined by a trypsin-taurocholate excystation test¹² and absence of germs was assured by testing the oocyst suspensions on Plate Count Agar and on Sabouraud plates. Animals were immunosuppressed when needed by administering 4 mg/L of Dexamethasone sodium phosphate (Dex) (Merck, Lyon, France) via the drinking water as previously described.⁶ Thirty two SCID mice were randomly divided into eight groups of four in capped cages according to the dose of *C. parvum* oocysts inoculated and to the administration or not of Dex. Four groups of mice without Dex were inoculated by oral route with 10⁵, 10⁶, 10⁷ or 10⁸ oocysts respectively, in 200 μ l of Phosphate-buffered saline (PBS). The other 4 groups were inoculated similarly but they received simultaneously oral Dex. Eight SCID mice constituted two control groups: four mice of CDex group received oral Dex and were inoculated with PBS, and four mice of CDV group received Dex and an inoculum from which oocysts (equivalent to 10⁶) were removed by filtration with a Nanosep MF tube with a 0.45 μ m pore size membrane. On days 20, 35, 46 and 57 post inoculation (PI), one mouse from each group was euthanatized by a sodium pentobarbital (Ceva, Libourne, France) intra-cardiac injection. The rationale for the days for euthanasia was decided according to our previous results⁶. The SCID mouse colony used in this work is regularly controlled for assessing the absence of microbial or parasitological infections, including *Helicobacter*. Experiments were performed according to the European guidelines (Council directives on the protection of animals for experimental and other

scientific purposes. J. Off. Communautés Européennes, 86/609/EEC, 1986, December 18th, L358).

Quantification of the oocyst shedding. Freshly excreted fecal pellets were collected three times a week from each pool of animals. Feces were weighted and suspended in 500 to 1000 µl de MilliQ water. The feces were thoroughly shaken to be homogenized. For each fecal sample, immunomagnetic separation (IMS) of oocysts was done using Dynabeads anti-*Cryptosporidium* kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Oocysts were detected and numbered after immunofluorescence (IF) using a FITC conjugate anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody (Cellabs Pty. Ltd, Croissy-Beaubourg, France). For quantification of oocysts microscopic count of a calibrate drop of 30 µl was made in 10 fields with an x40 objective lens. A calculation of the number of oocysts per milligram of feces was made.

Histological examination. Stomach, liver a section of the duodenum, pancreas, the ileo-caecal region, one section of the jejunum, three of the colon and lungs were removed from each mouse. Tissues were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Sections of 5 µm thick were either stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) or labeled using immunohistochemistry (see below). Stained slides were examined microscopically using a Leica DMRB microscope equipped with a Leica digital camera connected to an Imaging Research MCID analysis system. The presence of parasites in the tissues was scored as follows according to previous studies: 0, no parasites; 1+, small number of parasites focally distributed; 2+ moderate number of parasites widely distributed; 3+, abundant presence of parasites widely distributed throughout the tissue¹³. Pathological changes were classified according to the Nomenclature for Histologic Assessment of Intestinal Tumors in the Rodent.¹⁴ The presence of lesions was scored at the following sites: stomach, liver, duodenum, caecum and colon. Lesions were scored as follows: 0. no lesion; 1. inflammation; 2. low grade intraepithelial neoplasia; 3. high grade intraepithelial neoplasia or adenoma with high grade dysplasia (AHGD). The degree of severity of histological damage for each mouse was calculated by the sum of individual scores over the five organs. This score was created to transform qualitative data (observation of different lesions in different organs) in a quantitative data facilitating comparisons between groups.

Immunohistochemistry. Slides were treated with a pH 6 citrate buffer for 40 min at 99°C. After primary antibody incubation and a secondary biotinylated

antibody/streptavidin amplification step, antigen detection was carried out by DAB+ (Dako, Denmark). The primary antibody used was directed against Ki-67 (Rat Anti-Mouse Ki-67 antigen, Dako, Denmark, dilution 1:25). Ki-67 index was scored in a semi-quantitative manner according to the average of cells with positive nuclear staining (mean of 5 fields randomly selected).

Statistical analysis. An analysis of variance was conducted to account for the effects of relevant factors (inocula, Dex administration, day post-infection) and their interactions on average daily oocyst excretion. Data analysis was performed with the statistical software S-PLUS 2000 (MathSoft, Seattle, WA, USA). Logarithmic transformations of oocyst excretion values were used. An average amount of oocysts excreted per day was estimated from all the unitary values in each group of mice. Significance was defined as $P \leq 0.05$.

RESULTS

Intensity of infection according to the inoculum size and to the administration of Dex. The discharge of oocysts in the feces followed by IMS-IF was positive in all groups since the first day PI until the end of the study. However, the median of oocyst excretion during the experimentation increased according to the inoculum size and was substantially higher for Dex-treated mice compared to untreated ones, excepted for mice infected with 10^8 oocysts, treated or not with Dex (Figure 1). Among these mice oocyst shedding was lower in animals under Dex treatment. The highest excretion was observed in mice infected with 10^7 oocysts and treated with Dex. Analysis of variance showed that the day PI, the administration of Dex and the interaction between Dex and the inoculum size, significantly influenced the oocyst excretion ($P < 0.001$, $P: 0.005$, $P: 0.05$, respectively).

Intensity of the infection and degree of histological alterations. Whatever the inoculum size, histological lesions were observed in Dex-untreated SCID mice in stomach, liver and duodenum (Table 1). In eight out of sixteen mice (50%), parasites were detected in the antro-pyloric region in association with a slightly modified mucosa including the presence of glandular tubular structures with cellular atypias. These mucosal changes were found to be typical of low grade intraepithelial neoplasia, and appeared as early as day 35 PI with the highest inocula (10^7 and 10^8 , Table 1). In the liver, 81.3% mice showed periportal inflammation, associated in some cases with parasite

invasion of bile ducts. When severity of histological lesions was scored, Dex-untreated mice (Table 1) exhibited scores ≤ 4 .

On the opposite, Dex-treated mice (Table 1) showed more extended and severe lesions. In six out of sixteen animals (37.5%), lesions were distributed in more than one organ, with a maximum score of histological severity of 11 in one mouse (N°16, Table 1). Specifically, two mice had stomach lesions suggestive of low grade intraepithelial neoplasia, and one presented high grade intraepithelial neoplasia characterized by an increasing architectural distortion associating glandular crowding, prominent cellular atypias, and pseudostratified nuclei, without stromal invasion (Figure 2A, 2B). Two mice (N° 8 and 32, Table1) had low and high grade intraepithelial neoplasia in the duodenum, respectively. Additionally, six mice (18.8%) (N° 7, 8, 15, 16, 23 and 24, Table 1) presented in the caecum adenomas with high grade dysplasia after day 46 PI (Figure 2C, 2D), coinciding with the period of highest oocyst shedding. Three mice (9.9%) (N° 7, 15 and 16, Table 1) had these kind of lesions localized in the colon. Lesions in the large intestine were characterized by adenomatous masses that appeared closely packed, branching sometimes dilated tubular structures, separated by normal or inflammatory lamina propria. Focal cystic dilation was observed (Figure 2C). Some tubules were covered by a low or high grade dysplastic epithelium, which showed mucin depletion and nuclear stratification. In some areas, architectural distortion was associated with cellular atypias. Epithelial cells showed loss of normal polarity. As well, abnormal nuclear changes consisting of prominent nucleoli and irregularly scattered chromatin were recorded. Foci of merged glands typical of high grade dysplasia invading into lamina propria were found. Inflammatory changes were usually more limited in animals receiving Dex. Hepatobiliary inflammation and colonization by parasites was observed in three mice out of sixteen (18. 8%).

All neoplastic caecal lesions were found after day 46 PI. On the other hand, in some mice stomach lesions were found at day 35 PI (Table 1).

Figure 4 shows a significant correlation between severity score of histological lesions and the intensity of oocyst excretion ($r: 0.622, P < 0.001$). Additionally, the organs with more severe lesions (score 2 or 3) were always associated to the presence of oocysts (Table 1). For lesions with score of severity of 2 and 3, the presence of parasites in the tissues was between moderate and abundant in 93% and 78% of cases, respectively ($r: 0.83, P < 0.001$).

Intensity of the infection and immunohistochemical expression of Ki-67. An apparent increase of the mitosis number was observed in H&E stained sections of gastric or caecal epitheliums between days 20 and 35 PI, before histological evidence of neoplasia. To confirm that the dysplastic compartment at the top of the crypts represented abnormally proliferating cells, we stained the sections with an anti-Ki-67 antibody that reacts with an antigen in the nuclei of replicating but not quiescent cells. In low infected animals euthanatized at day 20 PI, Ki-67 staining was observed in nuclei of proliferating epithelial cells, at the lower third of gastric (data not shown) or caecal epithelium crypts (Figure 4A). But extension of the staining increased henceforth, especially in mice with higher parasite rates, leading to proliferation in the upper third of the crypts and in the surface epithelium (Figure 4C, 4D).

Occurrence of gastro-intestinal tumors. Either high grade neoplasia or AHGD were observed in 81.3% of mice euthanatized at day 46 PI or after. However, 100% of mice inoculated with 10^5 - 10^7 oocysts and euthanatized after day 46 post-infection showed lesions of grade 3 in the caecum according to the score of severity (Figure 2). After this day, nine infected animals (56.3%) developed intraepithelial neoplasia of low or high grade in the stomach (Figure 2), two (12.5%) in the duodenum, and three (18.8%) in the colon. Six mice exhibited neoplastic lesions in more than one organ. Furthermore, presence of biotic or abiotic factors in the inoculum suspension, maybe responsible for the observed neoplastic lesions, was discarded using CDV mice as controls. These animals did not present tissue lesions. *Cryptosporidium* oocysts were not found in feces or tissues of either CDex or CDV control mice.

DISCUSSION

The present work belongs to a series of experiments reporting the ability of *C. parvum* to induce neoplastic changes in the digestive epithelium of immunosuppressed mammals. Our current observations show an association between *C. parvum* infection and the generation of tumors in SCID mice, as we reported previously.⁶ Additionally, neoplastic lesions were found for the first time in stomach and duodenum of these animals.

In the present study higher doses of *C. parvum* inocula were tried and it was found that mice receiving Dex and infected with 10^6 and 10^7 oocysts experienced more severe infections than the ones inoculated with 10^5 parasites. In addition, we observed a

significant correlation between infection intensity and degree of histological alterations taking together Dex-treated or untreated mice. Besides this inoculum size expected effect, the mean number of excreted oocysts tended to decrease with the highest challenge inoculum (10^8) in Dex-treated mice. This paradoxical effect has been already reported in a clinical study carried out in healthy volunteers, and could be due to saturation of target cells.¹⁵ Whatever the inoculum size, an increased inflammatory response in Dex-untreated mice was observed. This result is in agreement with the ability of cryptosporidiosis to increase IL-15 levels and IFN γ mucosal response leading to the elimination of parasites,¹⁶ and the capacity of corticoids to inhibit innate immunity and to suppress IFN γ gene expression.¹⁷ In this sense, mice treated with Dex showed milder inflammation and had higher risk of developing severe infections.

Previous studies have associated cryptosporidiosis to the developing of tumor lesions. One report described an association between *Cryptosporidium* sp. and aural-pharyngeal polyps in iguanas. These polyps were pedunculated masses composed of glandular cystic structures lined by hyperplastic cuboidal to columnar epithelium, containing numerous parasites along the apical surfaces of the epithelial cells.¹⁸ Cystic hyperplasia of the colonic mucosa was also described in nude mice.¹⁹ However, none of these studies have described the presence of pre-malignant lesions associated to cryptosporidiosis.

In our study, in uninfected control mice epithelial cells of the gut were precisely lined up along the basement membrane showing uniformity among the glands. On the other hand, the gastro-intestinal lesions we observed in *Cryptosporidium* infected mice were rather dysplastic than hyperplastic because we did not observed the typical elongation of the colonic crypts described for hyperplasia.²⁰ We found dysplastic changes characterized by lack of uniform architecture of the glands, reduction of inter-glandular stroma, back to back glands, many nuclei were not longer lined up along the basement membrane, cytological atypias were more pronounced, with mucus secretion usually absent, with aberrant chromatin pattern not basally located. Numerous mitoses with abnormal mitotic figures were also present. According to nomenclature for rodent tumors this kind of lesions corresponds to adenoma with high grade dysplasia.¹⁴

In addition to the morphological abnormalities, the actual presence of neoplasia either in the stomach or in the caecum was consistent with the extension of Ki-67 staining above the basal third of the crypt. It has been suggested that a Ki-67 abnormal staining reflects an altered proliferative epithelium rather connected with neoplasia pathogenesis

than with hyperplastic lesions.¹⁰ In fact, according to the standards for histological assessment of intestinal tumors in mice,¹⁴ in hyperplastic epithelium, mitosis are located in the lower two thirds of the mucosa, nuclei lack significant atypia, are basally located, ovoid to round, usually uniformly dark with occasionally visible nucleoli.¹⁴ In our study the dysplastic epithelium at the tops of the crypts exhibited a markedly abnormal pattern of proliferation, similar to that observed in advanced neoplasms.²¹ Additionally, our immunohistochemical results using Ki-67 indicate that the alteration in cell proliferation occurs early in this process, before the histological diagnosis established after day 46 PI in duodenum and caecum, and after day 35 PI in the stomach.

C. parvum in SCID mice usually develops in enterocytes of small intestine and colon;⁹ duodenum and gastric locations are described less often. However, *C. parvum* stomach involvement has been reported in humans, especially in clinical studies focused on AIDS or severe immunodepressed patients.²² In the present study, we found parasites in the stomach in association with neoplastic lesions even in mice not receiving Dex, although more severe lesions were noticed in mice under corticoid.

Even though we did not find invasive tumor lesions, maybe due to the limited time of the experience (latest euthanasia at 57 day PI), all the histological changes described here can be considered as putative precursors to colon carcinoma. Human colorectal tumorigenesis is believed to involve a series of genetic changes leading to the initiation of the neoplastic process and the progression from normal epithelium to carcinoma, via the intermediate steps of dysplasia and adenoma.²⁰

Some pathogens have been linked to oncogenesis in humans.²³ Parasites such as *Schistosoma haematobium* or Opisthorchiidae (*Opisthorchis viverrini* and *O. sinensis*) have been linked to cancerogenesis on the basis of epidemiological data.²³ The bacterium *Helicobacter pylori* has been classified as oncogenic too due to its strong association with carcinoma of stomach and gastric lymphoma.²³ Despite the scarcity of information about links between human cryptosporidiosis and digestive neoplasia, some previous data suggested a possible causal association. In Spain, cryptosporidiosis and colonic adenocarcinoma were found simultaneously in a patient with severe and chronic diarrhea,⁴ and a possible role of *Cryptosporidium* in ADC development could not be ruled out.⁴ More recently, an epidemiological study in Poland reported 18% of cryptosporidiosis prevalence in patients with colorectal cancer.⁵ However, in this study

cryptosporidial infection was detected by ELISA (coproantigens) and parasites were not found in the tissues.

Carcinogenesis associated with microbial pathogens seems to be promoted by different mechanisms, such as chronic inflammation or oncogene insertion in the host genome.²⁴ Furthermore, *Theileria parva*, another apicomplexan parasite causes a lymphoproliferative disorder of cattle (East Coast fever).²⁵ This organism infects and transforms bovine lymphocytes resulting in tumors with metastatic/invasive potential by a mechanism associated to an inhibition of apoptosis. Upon invasion by *Theileria*, T cells undergo lymphoblastoid transformation.²⁵ Inhibition of apoptosis has also been reported in other apicomplexan protozoa such as *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* and *Cryptosporidium*.²⁶ *Cryptosporidium* is able to activate NF-κB pathway, preventing the induction of cell death early after infection. Apoptosis prevention probably benefits the parasite by stabilizing the host cell long enough to permit the development of the life cycle.²⁶ At the same time resistance to apoptosis could be an essential step in the progression to malignancy.⁸ Therefore, massive infection with *C. parvum* could be a risk for gut neoplasia as an adverse effect due to the inhibition of intestinal cell apoptosis.

In summary, this experimental study shows a correlation between intensity of cryptosporidiosis and severity of dysplastic lesions. Moreover, adenomas with low or high grade intraepithelial neoplasia were observed in different areas of the gut including stomach and duodenum. The use of Ki-67 supported the neoplastic nature of the described *Cryptosporidium*-induced epithelial transformation, and showed that histopathological alterations begin early, before confirming the neoplastic lesion with the standard coloration.

Although the present results and ongoing experiments have confirmed our first observations (Certad et al, 2007), further studies should be done to characterize at molecular level the *Cryptosporidium*-induced gastrointestinal neoplasia, and to explore its potential occurrence in humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Stephanos Papadopulos and Prof. Pierre Gosset, pathologists, for their precious points of view, very helpful for this work, and Prof. El Moukhtar Aliouat for his valuable advices.

Financial support: This work received financial support from the Ministry of Research, France (EA3609 Université de Lille 2), IFR142 (Institut Pasteur de Lille). G.C. was supported by a scholarship from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico of the Universidad Central de Venezuela. T.N. was supported by a French Ministry Research grant.

Gabriela Certad (Corresponding author): Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel : 33 320 87 71 56, Fax : 33 320 87 72 76. Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela (UCV), San José, Caracas, Venezuela gabriela.certad@pasteur-lille.fr

Tramy Ngouanesavanh : Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel : 33 320 87 71 56, Fax : 33 320 87 72 76 ndn.tramy@gmail.com

Karine Guyot : Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel : 33 320 87 71 56, Fax : 33 320 87 72 76 karine.guyot@pasteur-lille.fr

Nausicaa Gantois : Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel : 33 320 87 71 56, Fax : 33 320 87 72 76 nausicaa.gantois@pasteur-lille.fr

Thierry Chassat : Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel 33 3207786 thierry.chassat@pasteur-lille.fr

Anthony Mouray : Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel 33 3207729 anthony.mouray@pasteur-lille.fr

Nicolas Flament : Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel 33 3207729 nicolas.flament@pasteur-lille.fr

Laurence Fleurisse : Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille. Hôpital Saint Vincent de Paul. Bd. De Belfort BP 387, 59 020 Lille, France. Tel 33 320 87 45 62, Fax : 33 320 87 48 27. lfleurisse@yahoo.fr

Anthony Pinon : Unité de Sécurité Microbiologique, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel 33 3207263, anthony.pinon@pasteur-lille.fr

Laurence Delhaes : Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel : 33 320 87 71 56, Fax : 33 320 87 72 76. Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, France, laurence.delhaes@pasteur-lille.fr

Eduardo Dei-Cas : Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, 1, rue du Prof. Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel : 33 320 87 71 56, Fax : 33 320 87 72 76. Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, France, eduardo.dei-cas@pasteur-lille.fr

Colette Creusy : Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille. Hôpital Saint Vincent de Paul. Bd. De Belfort BP 387, 59 020 Lille, France. Tel 33 320 87 45 62, Fax : 33 320 87 48 27. cceusy@nordnet.fr

REFERENCES

1. Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JS, Xiao L, Millar BC, Rooney PJ, Snelling WJ, 2006. *Cryptosporidium*. Lett Appl Microbiol 43: 7-16.
2. Pozio E, Morales MA, 2005. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. Trends Parasitol 21: 58-63.
3. Okhuysen PC, Chappell CL, 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet? Int J Parasitol 32: 517-525.
4. Izquierdo J, Antunez I, Calderon MT, Perez Giraldo C, Munoz Sanz A, 1988. Diarrhea caused by *Cryptosporidium* and colonic neoplasia. Rev Clin Esp 182: 393-394.
5. Sulzyc-Bielicka V, Kuzna-Grygiel W, Kolodziejczyk L, Bielicki D, Kladny J, Stepień-Korzonek M, Telatynska-Smieszek B, 2007. Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. J Parasitol 93: 722-724.
6. Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A, Fleurisse L, Pinon A, Cailliez JC, Dei-Cas E, Creusy C, 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. Infect Agent Cancer 2: 22.
7. Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E, 2004. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. Infect Immun 72: 6061-6067.
8. Lowe SW, Lin AW, 2000. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis 21: 485-495.

9. Mead JR, Ilksoy N, You X, Belenkaya Y, Arrowood MJ, Fallon MT, Schinazi RF, 1994. Infection dynamics and clinical features of cryptosporidiosis in SCID mice. *Infect Immun* 62: 1691-1695.
10. Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, 1996. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 149: 381-387.
11. Aliouat EM, Martinez A, Jimenez E, Dei-Cas E, Mullet C, Delcourt P, Gargallo-Viola D, 1997. Development of *pneumocystosis* animal models: corticosteroid-treated Wistar rat; SCID mouse and nude rat. *J Eukaryot Microbiol* 44: 41S-42S.
12. Guyot K, Gireaudot-Liepmann MF, Cabon A, Riveau-Ricard I, Lange M, Delattre JM, Dei-Cas E, 2000. Influence Of US Epa 1622 Method Successive Steps On The Viability Of *Cryptosporidium* Oocysts. *Water Science & Technology* 41: 189-196.
13. Rasmussen KR, Healey MC, 1992. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect Immun* 60: 1648-1652.
14. Boivin GP, Washington K, Yang K, Ward JM, Pretlow TP, Russell R, Besselsen DG, Godfrey VL, Doetschman T, Dove WF, Pitot HC, Halberg RB, Itzkowitz SH, Groden J, Coffey RJ, 2003. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124: 762-777.
15. Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, DuPont HL, 1996. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J Infect Dis* 173: 232-236.
16. Dann SM, Wang HC, Gambarin KJ, Actor JK, Robinson P, Lewis DE, Caillat-Zucman S, White AC, Jr., 2005. Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan *Cryptosporidium*. *J Infect Dis* 192: 1294-1302.
17. Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M, 2007. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem* 282: 4021-4034.
18. Uhl EW, Jacobson E, Bartick TE, Micinilio J, Schimdt R, 2001. Aural-pharyngeal polyps associated with *Cryptosporidium* infection in three iguanas (*Iguana iguana*). *Vet Pathol* 38: 239-242.
19. Heine J, Moon HW, Woodmansee DB, 1984. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect Immun* 43: 856-859.
20. Luperchio SA, Schauer DB, 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect* 3: 333-340.
21. Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B, 2001. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2640-2645.

22. Clemente CM, Caramori CA, Padula P, Rodrigues MA, 2000. Gastric cryptosporidiosis as a clue for the diagnosis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Arq Gastroenterol* 37: 180-182.
23. Parkin DM, 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118: 3030-3044.
24. Khurana S, Dubey ML, Malla N, 2005. Association of parasitic infections and cancers. *Indian J Med Microbiol* 23: 74-79.
25. Dobbelaere DA, Fernandez PC, Heussler VT, 2000. *Theileria parva*: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cell Microbiol* 2: 91-99.
26. Heussler VT, Kuenzi P, Rottenberg S, 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* 31: 1166-1176.

Table 1. Experimental cryptosporidiosis in SCID mice: testing the influence of inoculum size and Dex administration on the severity of digestive lesions

Mice N°	Group ^a	Inoculum	Day of euthanasia (PI)	Log ₁₀ of oocysts/mg feces (at day of euthanasia)	Histopathological findings ^b (Presence of <i>C. parvum</i> organisms)										Score of severity ^c		
					Stomach		Liver		Duodenum		Caecum		Colon				
1	P	10 ⁵	20	2,87	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0
2			35	3,21	0	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1
3			46	3,91	0	(0)	1	(+2)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1
4			57	4,49	2	(+3)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4
5	PDex	10 ⁵	20	3,7	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0
6			35	4,01	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(+1)	0	(0)	0	(0)	0
7			46	4,94	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3	(+3)	2	(+3)	5	(0)	5
8			57	4,87	0	(0)	1	(0)	2	(+2)	3	(+3)	0	(0)	6	(0)	6
9	P	10 ⁶	20	4,21	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0
10			35	3,75	0	(0)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2
11			46	4,32	0	(0)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2
12			57	4,32	2	(+2)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3
13	PDex	10 ⁶	20	4,52	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0
14			35	4,23	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(+1)	0	(0)	0	(0)	0
15			46	5,08	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3	(+3)	2	(+1)	5	(0)	5
16			57	5,17	3	(+3)	1	(0)	1	(0)	3	(+3)	3	(+2)	11	(0)	11
17	P	10 ⁷	20	2,65	0	(0)	1	(+1)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1
18			35	4,42	2	(+2)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	3
19			46	4,41	2	(+2)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4
20			57	4,81	2	(+3)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4
21	PDex	10 ⁷	20	4,33	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	0	0	(0)	0	(0)	0
22			35	4,73	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(+1)	0	(0)	0	(0)	0
23			46	5,27	0	(0)	0	(0)	1	(0)	3	(+3)	0	(+1)	4	(0)	4
24			57	5,01	2	(+2)	0	(0)	1	(0)	3	(+3)	0	(+1)	6	(0)	6
25	P	10 ⁸	20	3,77	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0
26			35	4,39	2	(+2)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4
27			46	4,78	2	(+3)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4
28			57	4,87	2	(+3)	1	(0)	1	(0)	0	0	0	0	0	0	4
29	PDex	10 ⁸	20	3,7	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1
30			35	4,1	2	(+3)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2
31			46	4,24	0	(0)	1	(0)	1	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2
32			57	4,01	2	(+2)	0	(0)	3	(+1)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	5

^a Experimental groups were: P: *C. parvum* infected SCID mice; PDex: *C. parvum* infected Dex-treated SCID mice.

^b According to the lesions more frequently found, each site was scored as follows: 0: No lesion, 1: Inflammation, 2: Intraepithelial neoplasia low grade, and The presence of parasites in the tissues was scored as follows according to previous studies: 0, no parasites; 1+, small number of parasites focally distributed; 2+ moderate number of parasites widely distributed; 3+, abundant presence of parasites widely distributed throughout the tissue. 3: Intraepithelial neoplasia high grade or adenoma with high grade dysplasia. In parentheses were added the results of a histological semi-quantitative assessment of *C. parvum* organisms in the diverse organs (see 'Materials and Methods').

^c The degree of severity of histological damage for each mouse was calculated by the sum of individual scores over the five organs.

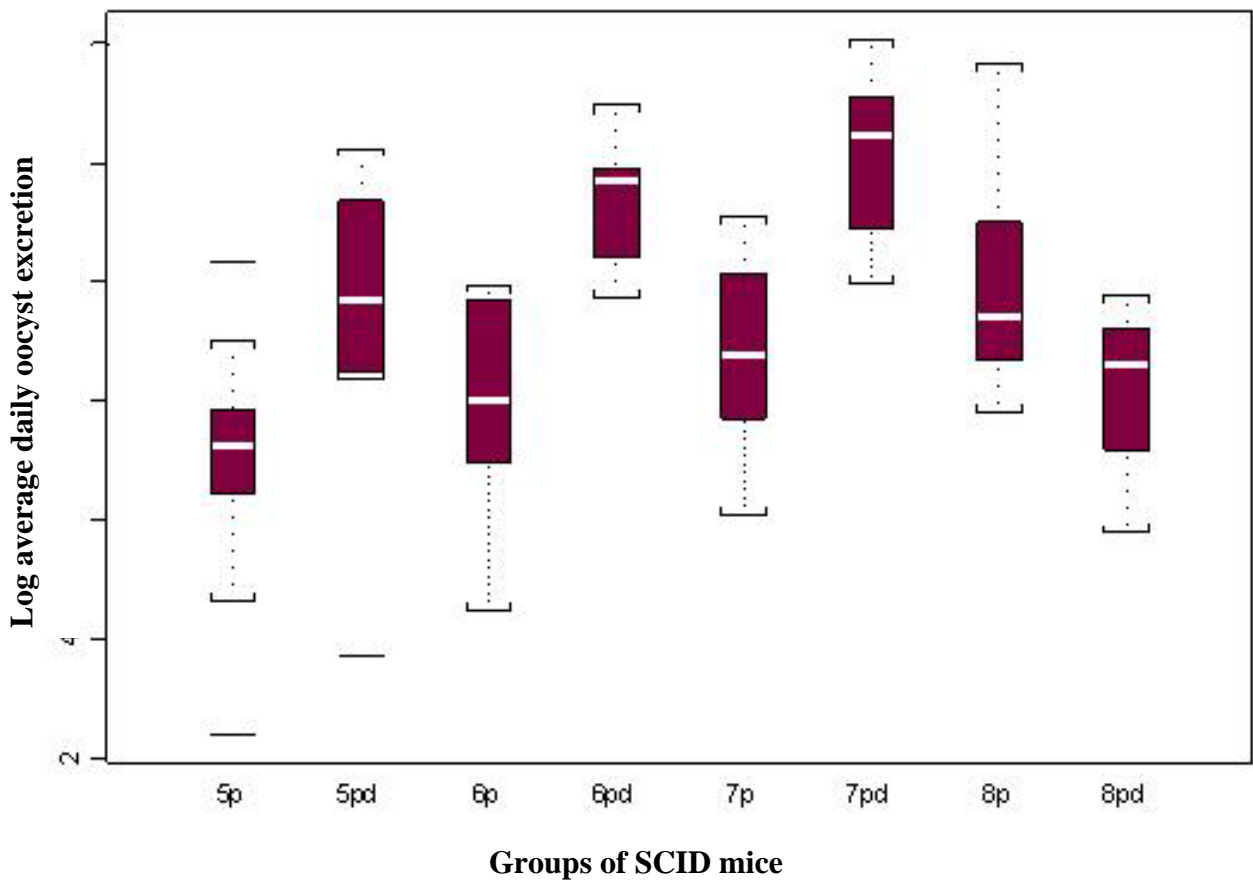


Figure 1. Napierian logarithm of daily oocyst excretion (oocyst/mg faeces) in different groups of mice. Each box represents the middle half of data, the white line being the median. Whiskers represent the extreme values within 1.5 times the box height.

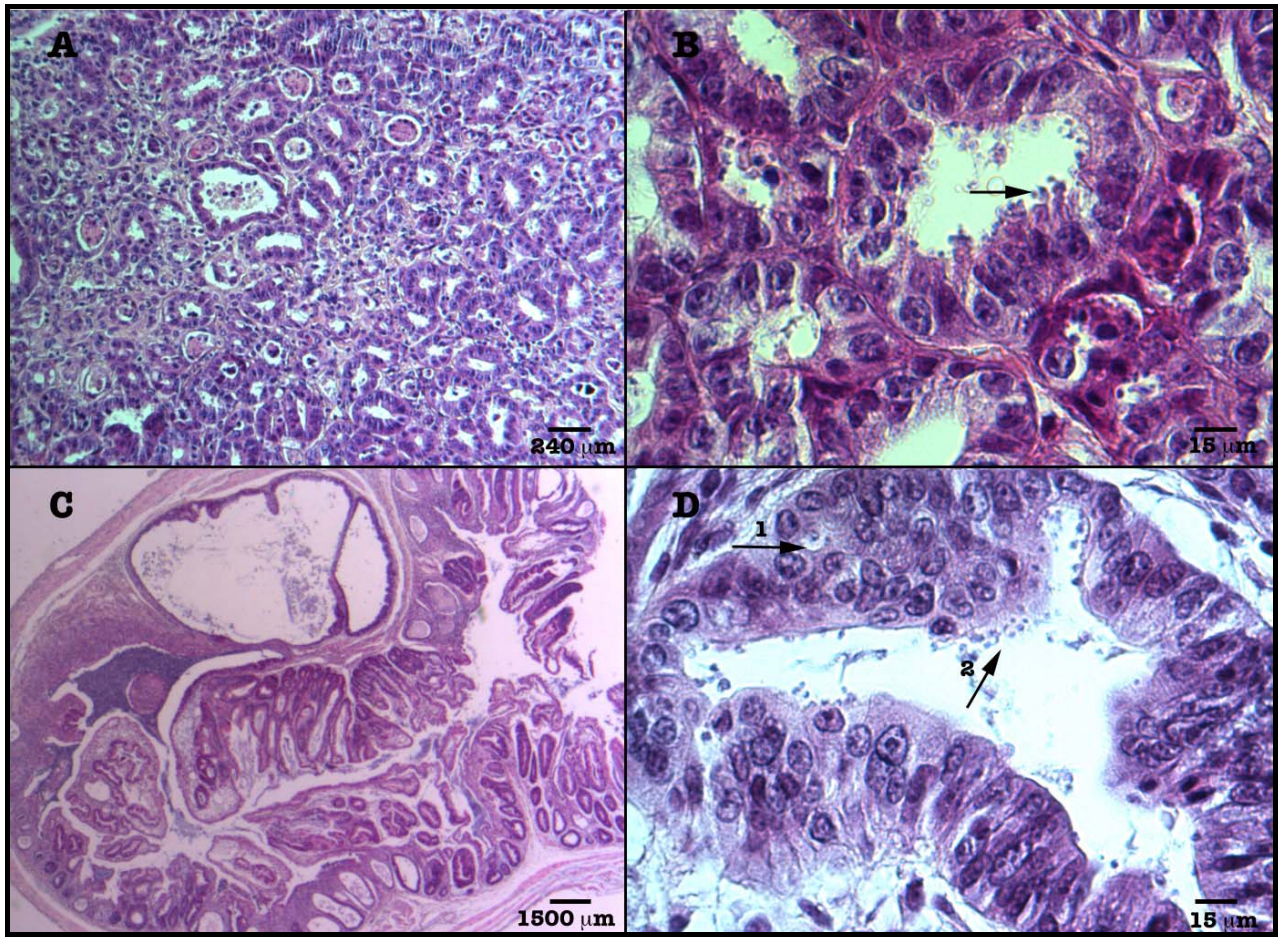


Figure 2. Antro-pyloric region of mouse N° 16 (Dex-treated SCID mice infected with 10^6 oocysts of *C. parvum*, euthanasia day 57 PI) (A and B). A, Intraepithelial neoplasia of high grade characterised by an architectural distortion of glands and presence of cellular atypias. Some epithelial cells presented loss of their normal polarity. B, Presence of numerous parasites inside the glands. Ileocaecal region of mouse N° 16 (C and D). C, Projection of a polypoid structure with focal cystic dilation developing inside the intestinal lumen. D, Areas of high grade dysplasia inside the polypoid structure (arrow 1) and presence of numerous parasites (arrow 2) (Hematoxylin & Eosin).

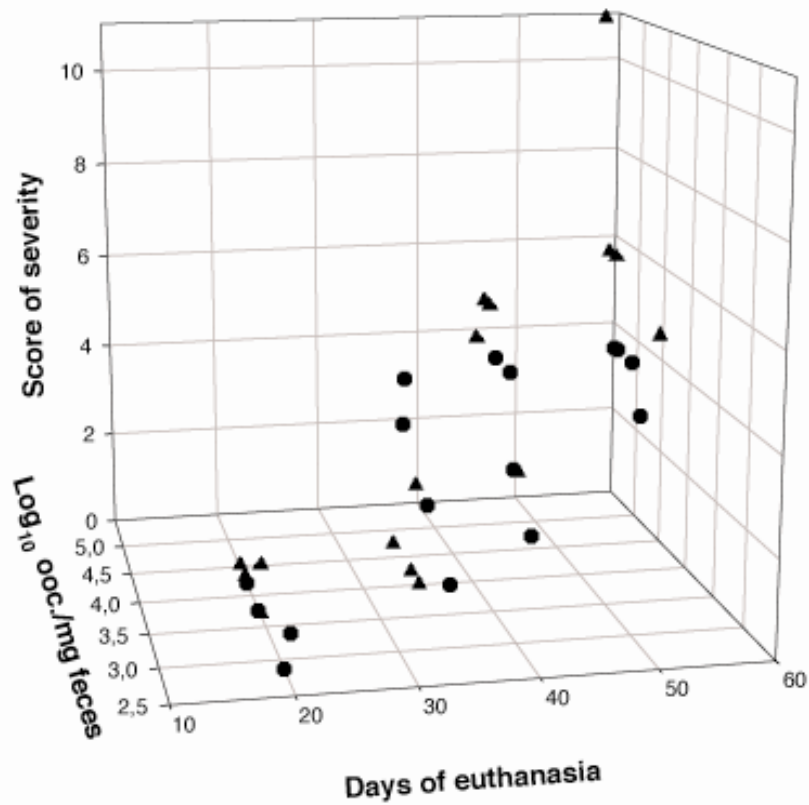


Figure 3. Correlation between the severity of histological lesions and the intensity of daily oocyst excretion. Each point represents one mouse. Circles: Dex-untreated mice, Triangles: Dex-treated mice. Note that majority of animals euthanatized between day 20 and 35 PI have score of severity < 2 (see Materials and Methods). All animal with score ≥ 2 (neoplastic lesions) were euthanatized after day 35 PI. There was a significant correlation between severity and oocyst excretion ($r: 0,83, P < 0.001$).

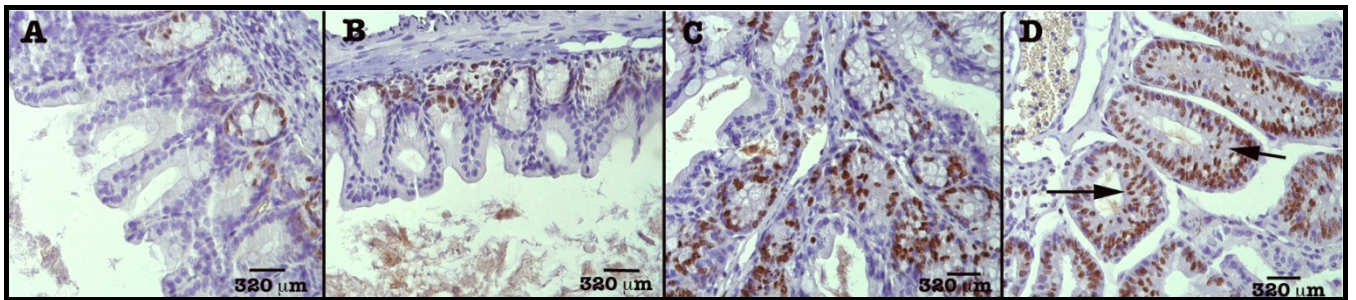


Figure 4. Expression of Ki-67 in the caecal epithelium of Dex SCID mice infected with 10^5 oocysts of *C. parvum*. A, Mouse euthanatized at day 20 PI: staining observed in the nuclei of proliferating cells at the lower third of the crypts, presence of 2-6 mitosis per glandular section. B, Mouse euthanatized at day 35 PI: stain confined to the lower third of the crypts, presence of 7-10 mitosis per glandular section. C, Mouse euthanatized at day 35 PI: increased extension of the staining, presence of 12-16 mitosis per glandular section. D, Mouse euthanatized at day 57 PI: extension of cellular proliferation, presence of 40-50 mitosis per glandular section. Arrows indicate proliferation in the upper third of the crypts and in the surface epithelium.

3. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MURIN DE CRYPTOSPORIDIOSE : TEST DE SUSCEPTIBILITE A DIVERSES ESPECES DE *CRYPTOSPORIDIUM*

3.1. LE MODELE SOURIS SCID SOUS DEXAMETHASONE

3.1.1. Article 7.

« *Cryptosporidium* species development in SCID mice : new data on *Cryptosporidium parvum*-induced gastro-intestinal neoplasia » (article soumis à Eukaryotic Cell)

Comme décrit précédemment, ce travail de thèse a permis la mise au point d'un nouveau modèle murin pour l'étude de l'infection par *Cryptosporidium* spp. En particulier, il nous a paru intéressant d'évaluer ce modèle dans le cas de différentes souches de *C. parvum* et de différentes espèces de *Cryptosporidium* non retrouvées chez les rongeurs. C'est le cas pour *C. molnari*, espèce parasite de poissons et de *C. hominis*, une espèce inféodée à l'homme (Smith *et al.*, 2007). Dans ce dernier article, on présente une recompilation de tous les résultats obtenus au cours de l'expérimentation animale pour montrer les différences phénotypiques existantes selon les espèces aux souches de *Cryptosporidium* considérées.

Les résultats suivants ont été obtenus :

1. L'effet de la Dex semble dépendre de l'espèce parasitaire. En effet, l'administration de Dex accentue l'infection chez les souris infectées avec *C. parvum* tandis qu'elle ne produit pas de changements chez les souris infectées avec *C. muris*.
2. L'infection est plus intense avec *C. muris* qu'avec *C. parvum*.
3. L'étude histopathologique a confirmé la localisation gastrique, préférentiellement fundique de *C. muris*.
4. Lorsque des nombres différents d'oocystes de *C. parvum* (Iowa) (10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8) ont été inoculés, des oocystes étaient détectables dans les fèces des souris de chaque groupe dès le lendemain de l'inoculation jusqu'à l'euthanasie. En l'absence de Dex, les souris SCID présentaient des moyennes des excrétions d'oocystes relativement faibles. L'excrétion d'oocystes a augmenté avec la taille de l'inoculum de départ. La plus forte moyenne d'excrétion d'oocystes a

été observée chez les souris SCID traitées avec Dex et inoculées avec 10^7 oocystes. Paradoxalement, les souris ayant reçu 10^8 oocystes présentent de faibles taux d'excrétion parasitaires. Chez les souris SCID non traitées par la Dex, une colonisation parasitaire a été constatée au niveau de l'estomac, principalement dans la région antro-pylorique, indépendamment de la taille de l'inoculum (Figura 1B, article N° 6).

5. Le résultat le plus marquant chez les animaux ayant ou pas reçu la Dex, était la constatation de lésions de néoplasie intra-muqueuse de bas et de haut grade, voire d'adénocarcinome *in situ* (selon la classification de Vienne) dans l'estomac, le duodénum, le caecum et le côlon. Ces lésions sont bien décrites dans les articles N° 5 et 6. Trente pourcent de ces souris présentait des lésions néoplasiques dans plus d'un organe digestif.
6. Lorsque différents inoculums contenant de nombres croissants d'oocystes de *C. parvum* souche TUM1 ont été testés, des oocystes ont été détectables dans les fèces des souris de chaque groupe dès le lendemain de l'inoculation jusqu'à l'euthanasie. Une sévérité inattendue de l'infection associée à une forte mortalité a été observée avec tous les inoculums après le jour 30 post-inoculation. Les animaux avec les taux d'excrétion d'oocystes les plus hauts ont développé une diarrhée. La présence de sang fécal a été confirmée chez une souris. L'étude histologique du caecum et de l'estomac a montré des lésions néoplasiques similaires à celles qui sont décrites chez les souris infectées par *C. parvum* souche Iowa (Figure N°1, article N° 7). Les lésions ont été associées à de nombreux parasites.
7. Les souris SCID traitées ou pas avec la Dex ont été réfractaires à l'infection avec *C. molnari* et *C. hominis*.
8. La souris SCID sous Dex s'est avérée être un modèle utile pour explorer la spécificité parasitaire d'espèces de *Cryptosporidium*, pour comparer leur comportement, pour perpétuer et amplifier des isolats pendant des périodes prolongées et pour aborder en détail l'étude de leurs effets pathologiques.

TITLE:

Cryptosporidium species development in SCID mice: new data on *Cryptosporidium parvum*-induced gastrointestinal neoplasia

RUNNING TITLE: *Cryptosporidium* induced gastro-intestinal neoplasia

AUTHORS:

Gabriela Certad^{1,2}, Colette Creusy³, Karine Guyot¹, Thierry Chassat⁴, Anthony Mouray⁴, Laurence Fleurisse³, Anthony Pinon⁵, Eduardo Dei-Cas^{1,6*}

AFFILIATIONS:

¹Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, France, ² Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela, ³ Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques (EA3609), Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille, France, ³ Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, France, ⁵ Unité de Sécurité Microbiologique, Institut Pasteur de Lille, France, ⁶Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, France

*Corresponding author:

Dr. Eduardo Dei-Cas
Pasteur Institute of Lille
1, rue du Prof. Calmette, BP245
59019 Lille, France

Phone: +333 2087 7155 / Fax: +333 2087 7276

E-mail: eduardo.dei-cas@pasteur-lille.fr

Potential conflict of interest: none

Abstract

We have developed a reproducible animal model of chronic cryptosporidiosis using dexamethasone-treated adult SCID mice in order to characterize comparatively the infections induced by different *Cryptosporidium* species. Using such a model, marked divergences between *Cryptosporidium* species were revealed: dexamethasone-untreated or treated SCID mice were susceptible to *C. parvum* and *C. muris* species. In contrast, *C. molnari*, a fish parasite, and *C. hominis*, an apparently human-specific species, did not develop in SCID mice. *C. parvum* IOWA strain, as in our previous report, or TUM1 strain, tested for the first time in the present work, did induce gastrointestinal intraepithelial neoplasia of low and high grades in SCID mice treated or not with dexamethasone, while *C. muris* chronic infection did not. High grade neoplasia development was observed in all mice infected with *C. parvum* IOWA or TUM1 strain after 39 days post-infection. *C. parvum* – induced neoplasia was not reported in other vertebrates. However, a few data suggest that a potential interaction between *Cryptosporidium* infection and colorectal cancer could occur in humans. Research on the topic could be worthwhile considering both the high prevalence of *Cryptosporidium* infection in developing countries and the high incidence of this infection in immunosuppressed populations of developed or developing areas.

Introduction

The genus *Cryptosporidium* consists of several species and genotypes which infect a wide range of hosts, including humans (41). These parasites are ubiquitous, and the usual lack of morphological differentiation between the species has made difficult to track down sources of human and animal infections. Some species are relatively well defined by their morphological and biological features, while others are still enigmatic and seem to represent cryptic species as revealed by molecular approaches. Molecular typing has shown that the main agents of human cryptosporidiosis are *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum*. However, aside these two species, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris*, and several infraspecific *Cryptosporidium* genotypes have also been reported in humans (33). Humans and animals with cryptosporidiosis can exhibit diverse expression of disease severity according to either host susceptibility to infection or virulence of the parasite isolate (26). To investigate these biological divergences and to contribute to the understanding of the dynamics of the infection, cellular cultures and animal models have been used. However, it has been difficult to set suitable cryptosporidiosis models, especially because most mammals are susceptible to the infection only as newborns (22).

Recently, we have developed a reproducible animal model of chronic cryptosporidiosis using dexamethasone (Dex)-treated adult SCID (severe combined immunodeficiency) mice in order to characterize comparatively the infections induced by different *Cryptosporidium* species (6). Using such model, oocyst shedding, clinical impact, location of the infection, associated histopathological changes in the gastrointestinal tract and virulence could be assessed, and marked divergence between *Cryptosporidium* species was revealed. Unexpectedly, we have found that *C. parvum* IOWA strain was able to induce the development of intestinal polyps with areas of intraepithelial neoplasia in chronically infected SCID mice (6). This important observation stimulated our interest and led us to explore the ability of other *C. parvum* strains or even other *Cryptosporidium* species to induce such pathological processes. Thus, we have performed several *in vivo* experiments using the same animal model to determine whether a non-IOWA strains of *C. parvum* or other *Cryptosporidium* species were able to both propagate and induce gut neoplasia in our Dexamethasone-treated SCID mouse model.

Materials and Methods

***Cryptosporidium* oocysts**

Cryptosporidium oocysts of different species and strains were obtained from sources indicated in Table 1 and stored in shipping medium (phosphate-buffered saline, PBS, with penicillin, streptomycin, gentamycin, amphotericin B and 0.01% Tween 20) at 4°C until use. Oocyst viability before inoculation was determined by a trypsin-taurocholate excystation (13) and absence of bacteria was assured by testing the oocyst suspensions on Plate Count Agar and on Sabouraud plates.

Animals

CB17-SCID mice between six and eight weeks were obtained from a colony bred at the Pasteur Institute of Lille (France), and maintained under aseptic conditions in an isolator with standard laboratory food and water *ad libitum*. All cages, food, water and bedding were sterilized before use. Fecal pellets were collected from all mice before inoculation to ascertain the absence of pre-existing *Cryptosporidium* infection. The SCID mouse colony used in this work is regularly controlled for assessing microbial or parasitological infections, including *Helicobacter* infection. An immunochromatographic HEM-Sign-3 test (V6063, Servibio, Meudon, France) was used to detect faecal occult blood (experiment N°3). The conditions for the care of laboratory animals, stipulated in European guidelines (Council directives on the protection of animals for experimental and other scientific purposes. J. Off. Communautés Européennes, 86/609/EEC, 1986, December 18, L358), were respected.

Experimental design

SCID mice were housed in capped cages individually during the first experiment or by groups in all the other experiments. Oral inoculation was done as indicated in table 1 with different amounts of oocysts in 200µl of PBS. When needed, SCID mice were chemically immunosuppressed by administering 4 mg/L of dexamethasone sodium phosphate (Dex) (Merck, Lyon, France) via the drinking water (Table 1). Immunosuppression was started two weeks prior to inoculation and was maintained during the whole experimentation. Dex-added drinking water was replaced three times a week.

In all the experiments there were control groups constituted by 4 animals inoculated only with PBS without or with Dex administration. In experiments 1 and 2 a further control group was

constituted by six SCID mice that received an inoculum from which oocysts were previously removed by filtration with a Nanosep MF tube with a 0.45 µm pore size membrane (6).

Quantification of oocyst shedding

To evaluate the intensity of oocyst shedding over the course of *Cryptosporidium* infection, freshly excreted faecal pellets were collected three times a week from each mouse and suspended in MilliQ water. Oocysts were detected and numbered after staining faecal smears by modified Ziehl-Neelsen stain (experiment No 1) (16) or after immunomagnetic separation (IMS) of oocysts using Dynabeads anti-*Cryptosporidium* kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) (the other experiments). Oocysts concentrated by IMS were counted after immunofluorescence (IF) staining using a FITC conjugate anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody (Cellabs Pty. Ltd, Croissy-Beaubourg, France).

Histological examination

At regular intervals or when signs of imminent death appeared, mice were euthanatized by a sodium pentobarbital (Ceva, Libourne, France) intra-cardiac injection. The liver, stomach and pancreas, a section of the duodenum, 3 sections of the jejunum, the caecum, and 3 sections of the colon were removed. Tissues were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Histological sections were stained with Hematoxylin and Eosin, and examined microscopically for the detection of *Cryptosporidium* organisms and/or histological modifications of the host tissue.

Nomenclature of Tumors

Pathological changes found in the mouse gut were typified according to Nomenclature for Histological Assessment of Intestinal Tumours in the Rodent (3). The Vienna classification of tumours of the digestive system (14, 36) was considered when comparisons were made with tumours of the digestive system in humans.

Statistical analysis

Analyses of data were performed with the statistical software S-PLUS 2000 (MathSoft, Seattle, WA, USA). For statistical analysis purposes, logarithmic transformations of oocyst excretion values were used. Wilcoxon rank sum tests were used to compare body weights or oocyst excretion. An analysis of variance was conducted to account for the effects of relevant factors and their interactions on average daily excretion of oocysts. An average amount of

oocysts excreted per day was estimated for each mouse from all the unitary values, and was represented as a function of the mouse group in a Box & Whiskers Plot. Significance was defined as $P \leq 0.05$.

Results

Cryptosporidium molnari and *C. hominis*

Neither *C. molnari* nor *C. hominis* developed in Dex-untreated or Dex-treated SCID mice. All fecal samples of mice infected with these two species and from control groups were negative since the beginning of the study until the end. The histological examination of the stomach, duodenum, jejunum, caecum and colon revealed absence of parasites or lesions.

Cryptosporidium muris RN66

C. muris infected mice treated or not with Dex became chronic shedders and produced high numbers of oocysts without statistical significant differences between the groups. Using modified Ziehl- Neelsen staining pre-patent periods ranged from 6 to 11 days (9.7 days in average) in Dex-untreated mice, and it was 11 days for all Dex-treated mice. However, the highly sensitive IMS-IF staining allowed the observation of oocysts in stools since the first day post-infection, likely showing the clearance of oocysts contained in the inoculum. Geometric means of oocyst excretion in Dex-untreated or Dex-treated SCID mice at euthanasia averaged 2840 and 2400 oocysts/mg feces, respectively (Table 2). No spontaneous mortality was observed but 2/6 Dex-treated mice were severely ill and were euthanatized before planned. At histological level, no difference between Dex-untreated and Dex-treated mice was observed. *C. muris* localization was restricted to the stomach, with no extra-gastric dissemination. Different stages of the parasite life cycle were present. Stomachs of all mice euthanatized at different dates, from day 20 to day 84 post-infection, were heavily infected mainly in fundic mucosae. Fundic gastric glands were dilated and covered by a flattened epithelium. Oxyntic cells were apparently less numerous than in control mice and preferentially visible in the deeper area. Fundic mucosa was twice thinner than in control mice while pyloric mucosa was similar to that in uninfected control mice. A moderate inflammatory infiltrate, made of mononuclear cells and neutrophile polymorphonuclears, was observed in some cases.

***Cryptosporidium parvum* IOWA strain**

The discharge of oocysts assessed by IMS-IF showed that all groups of SCID mice infected with *C. parvum* IOWA strain presented oocysts in the feces since the first day after inoculation until the end of the study. The intensity of the infection increased regularly for all titration groups receiving or not Dex. However, in the groups treated with Dex, the shedding of oocysts showed a decreasing trend after day 50 for inoculums of 10^7 and 10^8 oocysts. The groups of Dex-untreated mice had substantially lower parasite loads throughout the study with an oocyst excretion rate low and sporadic (Table 2). In contrast, in Dex-treated mice it was higher ($P = 0.002$) and chronic (Table 2). No spontaneous mortality was observed but since 28 days post-infection three out of six Dex-treated SCID mice were severely ill and required euthanasia. Analysis of variance showed that the post-infection time period, the administration of Dex and the interaction between Dex and the size of the inoculum, significantly influenced oocyst excretion ($P= 0.01$, $P < 0.001$, $P= 0.001$, respectively).

Although inflammatory changes were usually mild, marked histopathological changes were recorded in both Dex-untreated- and Dex-treated mice. A significant correlation ($r: 0.622$, $P < 0.001$) between the severity of histological lesions and the intensity of oocyst excretion was observed. This correlation was examined in detail elsewhere (Certad et al, submitted for publication).

In about 50% of Dex-untreated SCID mice (Table 2), parasites were detected in the antropyloric region in association with a slightly modified mucosa showing glandular tubular structures with cellular atypias. These mucosal changes were found to be typical of low grade intraepithelial neoplasia (according to nomenclature of (3), and appeared as early as day 35 post-infection with the highest inocula (10^7 and 10^8 , Table 2). In the liver, about 80% of Dex-untreated mice showed peri-portal inflammation, sometimes associated with parasite invasion of bile ducts.

On the whole, Dex-treated mice (Table 2) showed more extended and severe lesions than Dex-untreated ones. In about 40% of animals, lesions were distributed in more than one gastro-intestinal organ. Specifically, two mice had gastric lesions suggestive of low grade intraepithelial neoplasia, and one animal presented high grade intraepithelial neoplasia characterized by an increasing architectural distortion associating glandular crowding, prominent cellular atypias, and pseudostratified nuclei, but without stromal invasion. Some

mice had either low or high grade intraepithelial neoplasia in the duodenum. Lesions in the large intestine were most frequent in Dex-treated mice. Strikingly, 100% of mice inoculated with 10^5 - 10^7 oocysts and euthanized after day 46 post-infection showed high grade intraepithelial neoplasia or adenomas with high grade dysplasia in the caecum (Fig. 1B, 1C and 2) coinciding with the period of highest oocyst shedding. Lesions were characterized by closely packed, adenomatous masses that appeared branching, sometimes dilated tubular structures, separated by normal or inflammatory lamina propria. Focal cystic dilation was frequent (Fig. 1B). In some areas, architectural distortion was associated with epithelial atypias consisting of loss of normal polarity, nuclear stratification, prominent nucleoli and irregularly scattered chromatin (Fig. 1F and 2). Low or high grade dysplasia was frequently associated with mucin depletion. Hepatobiliary inflammation and colonization by parasites were sometimes also observed.

***Cryptosporidium parvum* TUM1 strain**

The experiment No 3 (Tables 1 and 2) aimed at determining if non-IOWA strains of *C. parvum* were able to induce digestive neoplasia in SCID mice. Therefore, an experiment was developed using *C. parvum* TUM1 strain isolated from a calf about 18 months ago (Dr Akiyoshi, personal communication). In this experiment, three inoculum sizes were tested, and all animals were administered with Dex (Table 1). Regardless inoculum size, all groups of SCID mice infected with *C. parvum* TUM1 strain showed oocysts in the feces since the day-1 post-infection until the end of the experiment. An unexpected severity of the infection associated with high mortality was observed with all inocula after 30 days post-infection. High spontaneous mortality was recorded as early as the 34th day post-infection in mice infected with 10^5 or 10^6 (4/8) and 10^7 oocysts (3/4). All animals, which showed the highest oocyst excretion rates (Table 2), developed diarrhea. In one animal, stools were reddish and the presence of fecal blood was confirmed using HEM-Sign-3 test. Results of this test were negative in other infected or uninfected (control) animals. Two animals with diarrhea and evident clinical aggravation had to be euthanized. In the two mice, necropsy showed hemorrhagic caecum, with an important increase in size (Fig. 1A). Histology of enlarged caecums showed similar neoplastic lesions to those described above in mice infected with *C. parvum* IOWA strain. The lesions, which appeared earlier (39 days post-infection), were associated with numerous parasites (Fig. 1D-F). Gastric low grade neoplastic lesions were also observed (Fig. 1I). Neither parasites nor lesions were observed in the liver.

Control groups

No *Cryptosporidium* development and no histological lesions were recorded in control groups inoculated with either PBS or an inoculum from which oocysts were previously removed by filtration.

Discussion

Observations reported herein resulted from experiments in which SCID mice treated or not with Dex were challenged with different doses of *C. parvum* oocysts and euthanized sequentially after infection for histological examination. The initial objective of this series of experiments was to set a reproducible animal model allowing to propagate *Cryptosporidium* isolates of the 'French *Cryptosporidium* Network Collection' (French Society of Professors of Medical Parasitology - ANOFEL) in the laboratory in order to explore comparatively their phenotypic features.

SCID mice were selected as experimental hosts. They have been shown to be susceptible to *Cryptosporidium* infection and to develop chronic disease due to their defect in T and B lymphocytes (30, 32, 38, 40). Dexamethasone, a synthetic glucocorticosteroid, was added in order to inhibit both the priming of the innate immune response (12) and IFN γ -regulated gene expression (35). Indeed, we have long experience with this Dex-treated SCID mouse model that proved to be highly reproducible and efficient for propagating *Pneumocystis murina*, another opportunistic agent (7).

Four *Cryptosporidium* species were tested: *C. molnari*, *C. hominis* TU502, *C. muris* RN66, and *C. parvum* IOWA and TUM1 strains. *C. molnari* was recently described as a new species in two marine fish species, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* (1). Although the present results need to be confirmed, the failure of *C. molnari* to develop in SCID mice suggests this species is not able to grow in the digestive tract of mammals and therefore is not pathogenic to humans. The lack of development of *C. hominis* in SCID mice was an expected event as this species was isolated exclusively from human hosts until now. Consistently, *C. hominis* isolates did not develop in cattle or rodents (25). However, isolates of this species could be propagated in a neonatal pig model (40).

C. muris and two strains of *C. parvum* developed chronic infection in SCID mice. The level of oocyst excretion was relatively high but lower than in mice infected with *C. parvum* TUM1 strain (Table 2). *C. muris* developed abundant gastric parasitism in either Dex-untreated or

Dex-treated SCID mice. No major differences were observed in the location of the infection by *C. muris*, abundance of parasites or severity of the associated gastric changes between groups of Dex treated or untreated SCID mice (6). The lack of influence of Dex administration was consistent with recent observations showing that degree of immunosuppression did not influence the mouse susceptibility to *C. muris* infection (24).

C. parvum IOWA or TUM1 strains developed chronic infection in SCID mice associated to digestive neoplasia as reported previously in *C. parvum* IOWA infected mice (6). Infection was enhanced by the administration of Dex. Oocysts were detected since the first day post-inoculation in the experiments performed with the two strains, but *C. parvum* TUM1 strain induced higher mortality (58%) and more extensive infection than *C. parvum* IOWA strain (20% mortality). Two *C. parvum* TUM1-infected mice developed an early and fast aggravation; and histology revealed the presence of caecal polyps with areas of low- and high grade intraepithelial neoplasia associated with numerous parasites (Table 2, Fig 1). In short, 100% of Dex-treated SCID mice infected with *C. parvum* (IOWA or TUM1 strains) euthanatized after 39 days post-infection developed caecal polyps with areas of intra-epithelial neoplasia. Therefore, the ability to induce neoplasia was not restricted to the IOWA strain of *C. parvum*. In addition, some Dex-treated SCID mice developed gastric or duodenal low or high grade neoplastic changes and some dex-untreated mice developed low grade neoplasia of the stomach. The severity of the neoplastic process was correlated with the inoculum size (these data are given in detail elsewhere).

Epithelial dysplastic lesions can be challenging to pathologists as they are difficult to identify, to interpret and weakly reproducible (31). Moreover, dysplasia-related terminology is continuously changing according to schools of thought, countries or other factors. However, the most serious lesions observed in *C. parvum* infected SCID mice correspond clearly to severe epithelial dysplasia (31) as cytological anomalies are marked, epithelial differentiation features are often lost, mitoses are frequent, located in abnormal places, as we showed previously using Ki67 immunodetection (Certad *et al*, submitted for publication), and architecture is considerably reshaped. This biological characterization goes through diverse tumor classifications. Thus, in the classification of intestinal tumors in rodents, the lesions we found in *C. parvum*-infected SCID mice correspond well to either "gastrointestinal neoplasia", which "may be referred to as microadenoma, microcarcinoma, carcinoma *in situ*, and focal areas of dysplasia" (3), or to "adenoma" or circumscribed broad-based, sessile or

pedunculated tumors lined by dysplastic epithelium, with either low grade dysplasia or high grade dysplasia (3). In the Vienna classification of human gastrointestinal neoplasia (36) like in the revised versions of such classification (31), most severe lesions we have found correspond to subcategory 4.2: "non-invasive carcinoma (carcinoma *in situ*)".

We did not find reports of *Cryptosporidium*-induced neoplasia or dysplasia before our first work on the topic (6). In contrast, *Cryptosporidium* was reported to be capable of inducing hyperplasia. This process, which is characterized by gross thickening of the mucosa but lacking of cellular atypia, is not related with pre-malignant lesions (3). Thus, in nude mice, *Cryptosporidium* sp. infection was associated with crypt hyperplasia in the lower small intestine and cystic hyperplasia with abscess in crypts in the large intestine (15). Likewise, in SCID mice, *C. parvum* (cervine isolate) infection induced also crypt hyperplasia in lower ileum, caecum, and colon after 13 weeks post-infection (22). Interestingly, these authors notice that "epithelial cells often appeared morphologically abnormal"; however, they did not evoke dysplasia, and no photo was shown in their paper. Furthermore, *Cryptosporidium* sp. was reported to induce aural-pharyngeal pedunculated polyps in iguanas (11, 39). Here again the lesion was hyperplasia, as attested by nice iconography.

Even though we did not find invasive tumor lesions, maybe due to the limited time of the experiments (latest euthanasia at 12 weeks post-infection), all the gastrointestinal dysplastic changes induced by *C. parvum* in SCID mice described here, can be considered as putative precursors to colon carcinoma. Actually, colorectal tumorigenesis is believed to involve a series of genetic changes leading to the initiation of the neoplastic process and the progression from normal epithelium to carcinoma, via the intermediate steps of dysplasia and adenoma (20).

What about the human host? To our knowledge, data supporting clearly a potential role of *C. parvum* in human colorectal cancer are unavailable. However, a recent paper reported 18% of cryptosporidiosis prevalence (about 45-fold higher than prevalence usually found in Europe general population) in 55 patients with colorectal cancer in Warsaw (Poland) (37). This report reinforces the interest of our experimental results that were obtained using a severely immunosuppressed host. With regard to HIV-infected subjects known to be highly susceptible to *Cryptosporidium* infections, an incidence of colorectal cancer 2.3-fold (1.8 to 2.9) higher than in the general population was reported (28). Consistently, in another study the prevalence of neoplastic lesions (adenomas or adenocarcinomas) in the distal colon was 25.5% in HIV-

infected patients versus 13.1% ($P < 0,001$) in control subjects (2). Unfortunately, *Cryptosporidium* infection is not usually searched in patients with colorectal cancer.

Until now some parasites have been associated to cancerogenesis (18, 19, 27, 29, 34), mostly on the sole basis of epidemiological data. However, in the case of *Theileria parva*, an apicomplexan parasite that causes a lymphoproliferative disorder of cattle (East Coast fever), it is known that the mechanism of cellular transformation is associated to an inhibition of apoptosis that results in the generation of tumors with metastatic/invasive potential (10). Interestingly, inhibition of apoptosis has also been reported in *Cryptosporidium* (8, 9, 21) maybe to lengthen host cell life for favoring its intracellular development. In fact, this apoptosis inhibition process could also favor gastrointestinal epithelial neoplasia.

In summary, Dex-untreated or Dex-treated SCID mice revealed to be susceptible to *C. parvum* and *C. muris* species of the Apicomplexan genus *Cryptosporidium*. In contrast, *C. molnari*, a fish parasite, and *C. hominis*, a species with apparently restricted host specificity, did not develop in SCID mice. *C. parvum* induced gastrointestinal intraepithelial neoplasia of low and high grades in Dex-untreated or Dex-treated SCID mice with chronic cryptosporidiosis. In contrast, *C. muris* chronic, extensive infection of SCID mice was not associated with neoplasia. High grade neoplasia development was observed in all mice infected with *C. parvum* IOWA or TUM1 strain after 39 days post-infection. To our knowledge, *C. parvum* – induced neoplasia was not reported in other vertebrates. However, a few recent data suggest that a potential interaction between *Cryptosporidium* infection and colorectal cancer could occur in humans (37). Our results are in agreement with the fact that humans and animals with cryptosporidiosis can exhibit diverse expression of disease severity according to either host susceptibility to infection or virulence of the parasite isolate (26). Research on the topic could be worthwhile considering the high prevalence of *Cryptosporidium* infection in developing countries, p.e. 89% of children attending day-care centers in Trujillo State, Venezuela (23) or its high incidence in immunosuppressed populations of developed or developing areas (5, 17, 37).

Acknowledgments

We would like to thank Donna Akiyoshi and Saul Tzipori (Tuft University, Boston, USA) for kindly donating the oocysts of *C. hominis* and *C. parvum* TUM1 strain, and Pilar Alvarez Pellitero (Castellon, Spain) for gently providing oocysts of *C. molnari*. Thanks are also

extended to Jean-Pierre Decavel and Nicolas Flament at the “Plateau d'Expérimentation Animale” of the Institute Pasteur of Lille. Precious points of view of the pathologists Pierre Gosset and Stephanos Papadopulos were very helpful for this work. This work received financial support from the Ministry of Research, France (EA3609 Université de Lille 2), IFR142 (Institut Pasteur de Lille). G.C. was supported by a scholarship from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico of the Universidad Central de Venezuela. We acknowledge USA National Institute for Allergy and Infectious Diseases for support (grant R13AI078718).

References

1. **Alvarez-Pellitero, P., and A. Sitja-Bobadilla.** 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol* **32**:1007-1021.
2. **Bini, E. J., J. Park, and F. Francois.** 2006. Use of flexible sigmoidoscopy to screen for colorectal cancer in HIV-infected patients 50 years of age and older. *Arch Intern Med* **166**:1626-1631.
3. **Boivin, G. P., K. Washington, K. Yang, J. M. Ward, T. P. Pretlow, R. Russell, D. G. Besselsen, V. L. Godfrey, T. Doetschman, W. F. Dove, H. C. Pitot, R. B. Halberg, S. H. Itzkowitz, J. Groden, and R. J. Coffey.** 2003. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* **124**:762-777.
4. **Cama, V. A., M. J. Arrowood, Y. R. Ortega, and L. Xiao.** 2006. Molecular characterization of the *Cryptosporidium parvum* IOWA isolate kept in different laboratories. *J Eukaryot Microbiol* **53 Suppl 1**:S40-42.
5. **Certad, G., A. Arenas-Pinto, L. Pocaterra, G. Ferrara, J. Castro, A. Bello, and L. Nunez.** 2005. Cryptosporidiosis in HIV-infected Venezuelan adults is strongly associated with acute or chronic diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* **73**:54-57.
6. **Certad, G., T. Ngouanesavanh, K. Guyot, N. Gantois, T. Chassat, A. Mouray, L. Fleurisse, A. Pinon, J. C. Cailliez, E. Dei-Cas, and C. Creusy.** 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect Agent Cancer* **2**:22.
7. **Chabé, M., E. Dei-Cas, C. Creusy, L. Fleurisse, N. Respaldiza, D. Camus, and I. Durand-Joly.** 2004. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**:89-97.
8. **Chen, X. M., G. J. Gores, C. V. Paya, and N. F. LaRusso.** 1999. *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am J Physiol* **277**:G599-608.
9. **Chen, X. M., S. A. Levine, P. L. Splinter, P. S. Tietz, A. L. Ganong, C. Jobin, G. J. Gores, C. V. Paya, and N. F. LaRusso.** 2001. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* **120**:1774-1783.
10. **Dobbelaere, D. A., P. C. Fernandez, and V. T. Heussler.** 2000. *Theileria parva*: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cell Microbiol* **2**:91-99.
11. **Fitzgerald, S. D., P. G. Moisan, and R. Bennett.** 1998. Aural polyp associated with cryptosporidiosis in an iguana (*Iguana iguana*). *J Vet Diagn Invest* **10**:179-180.

12. **Franchimont, D.** 2004. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* **1024**:124-137.
13. **Guyot, K., M. F. Gireaudot-Liepmann, A. Cabon, I. Riveau-Ricard, M. Lange, J. M. Delattre, and E. Dei-Cas.** 2000. Influence Of US Epa 1622 Method Successive Steps On The Viability Of *Cryptosporidium* Oocysts. *Water Science & Technology* **41**:189-196.
14. **Hamilton, S. R., L. A. Aalfonen, and eds.** 2000. Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System. WHO classification of tumours. IARC Press, Lyon.
15. **Heine, J., H. W. Moon, and D. B. Woodmansee.** 1984. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect Immun* **43**:856-859.
16. **Henriksen, S. A., and J. F. Pohlenz.** 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* **22**:594-596.
17. **Hunter, P. R., and G. Nichols.** 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* **15**:145-154.
18. **Ishii, A., H. Matsuoka, T. Aji, N. Ohta, S. Arimoto, Y. Wataya, and H. Hayatsu.** 1994. Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A review. *Mutat Res* **305**:273-281.
19. **Khurana, S., M. L. Dubey, and N. Malla.** 2005. Association of parasitic infections and cancers. *Indian J Med Microbiol* **23**:74-79.
20. **Luperchio, S. A., and D. B. Schauer.** 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect* **3**:333-340.
21. **McCole, D. F., L. Eckmann, F. Laurent, and M. F. Kagnoff.** 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* **68**:1710-1713.
22. **McDonald, V., R. Deer, S. Uni, M. Iseki, and G. J. Bancroft.** 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect Immun* **60**:3325-3331.
23. **Miller, S. A., C. L. Rosario, E. Rojas, and J. V. Scorza.** 2003. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health* **8**:342-347.
24. **Miller, T. A., M. W. Ware, L. J. Wymer, and F. W. Schaefer, 3rd.** 2007. Chemically and genetically immunocompromised mice are not more susceptible than immunocompetent mice to infection with *Cryptosporidium muris*. *Vet Parasitol* **143**:99-105.
25. **Morgan-Ryan, U. M., A. Fall, L. A. Ward, N. Hijjawi, I. Sulaiman, R. Fayer, R. C. Thompson, M. Olson, A. Lal, and L. Xiao.** 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *J Eukaryot Microbiol* **49**:433-440.
26. **Okhuysen, P. C., and C. L. Chappell.** 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet? *Int J Parasitol* **32**:517-525.
27. **Parkin, D. M.** 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* **118**:3030-3044.
28. **Patel, P., D. L. Hanson, P. S. Sullivan, R. M. Novak, A. C. Moorman, T. C. Tong, S. D. Holmberg, and J. T. Brooks.** 2008. Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. *Ann Intern Med* **148**:728-736.
29. **Qiu, D. C., A. E. Hubbard, B. Zhong, Y. Zhang, and R. C. Spear.** 2005. A matched, case-control study of the association between *Schistosoma japonicum* and liver and colon cancers, in rural China. *Ann Trop Med Parasitol* **99**:47-52.

30. **Rueda, C., S. Fenoy, F. Simon, and C. Del Aguila.** 2008. Bobel-24 activity against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in a SCID mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1150-1152.
31. **Scoazec, J. Y.** 2007. Dysplasie en muqueuses glandulaires digestives: nouvelles terminologies, nouvelles classifications. *Ann Pathol* **27**:398-416.
32. **Seydel, K. B., and S. L. Stanley, Jr.** 1996. SCID mice and the study of parasitic disease. *Clin Microbiol Rev* **9**:126-134.
33. **Smith, H. V., S. M. Caccio, N. Cook, R. A. Nichols, and A. Tait.** 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol* **149**:29-40.
34. **Sripa, B., S. Kaewkes, P. Sithithaworn, E. Mairiang, T. Laha, M. Smout, C. Pairojkul, V. Bhudhisawasdi, S. Tesana, B. Thinkamrop, J. M. Bethony, A. Loukas, and P. J. Brindley.** 2007. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med* **4**:e201.
35. **Stojadinovic, O., B. Lee, C. Vouthounis, S. Vukelic, I. Pastar, M. Blumenberg, H. Brem, and M. Tomic-Canic.** 2007. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem* **282**:4021-4034.
36. **Stolte, M.** 2003. The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: advantages and disadvantages. *Virchows Arch* **442**:99-106.
37. **Sulzyc-Bielicka, V., W. Kuzna-Grygiel, L. Kolodziejczyk, D. Bielicki, J. Kladny, M. Stepien-Korzonek, and B. Telatynska-Smieszek.** 2007. Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. *J Parasitol* **93**:722-724.
38. **Takeuchi, D., V. C. Jones, M. Kobayashi, and F. Suzuki.** 2008. Cooperative role of macrophages and neutrophils in host Antiprotozoan resistance in mice acutely infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* **76**:3657-3663.
39. **Uhl, E. W., E. Jacobson, T. E. Bartick, J. Micinilio, and R. Schimdt.** 2001. Aural-pharyngeal polyps associated with *Cryptosporidium* infection in three iguanas (*Iguana iguana*). *Vet Pathol* **38**:239-242.
40. **Widmer, G., D. Akiyoshi, M. A. Buckholt, X. Feng, S. M. Rich, K. M. Deary, C. A. Bowman, P. Xu, Y. Wang, X. Wang, G. A. Buck, and S. Tzipori.** 2000. Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* **108**:187-197.
41. **Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan, and S. J. Upton.** 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* **17**:72-97.

Table 1. Testing SCID mice susceptibility to *Cryptosporidium* species: experimental design (number of mice per group)

Exp N ^o	<i>Cryptosporidium</i> species	Strain, origin	Inoculum size (number of oocysts)											
			10 ⁵		10 ⁶		4x10 ⁶		10 ⁷		10 ⁸			
			-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
1	<i>C. muris</i>	RN66, Waterborn Inc, USA	6	6										
	<i>C. parvum</i>	IOWA ^a , Waterborne Inc, USA	6	6										
2	<i>C. parvum</i>	IOWA, Waterborne Inc, USA	4	4	4	4	ND	ND	4	4	4	4		
3	<i>C. parvum</i>	TUM1 ^b , Tufts Cummings School of Veterinary Medicine, (Dr. S. Tzipori)	ND	4	ND	4	ND	ND	ND	4				
4	<i>C. molnari</i>	Institut Acuicultura Torre la Sal (CSIC), Ribera de Cabanes, Castellón, Espagne (Dr. P. Alvarez)	6	6										
5	<i>C. hominis</i>	TU502, Tufts Cummings School of Veterinary Medicine, (Dr. S. Tzipori)	4	4										

Exp: experiment

^a Isolated from calf in initial isolation in the late 1970s, IOWA has been maintained and propagated using either the newborn calf or mouse infection models (4).

^b Isolated from calf about 18 months ago.

In shadow: Doses not tested for that experiment.

Table 2. Development of *Cryptosporidium* species in SCID mice: associated lesions^a

<i>Cryptosporidium</i> species and strain	Dexamethasone administration	Oocysts/mg feces (mean±SD) ^b	P value	Number of mice presenting lesions (%)				
				Description of lesions				
				Stomach	Small intestine	Ileocaecal region	Colon	Liver
<i>C. muris</i> RN66 ^c	Non	2 834 ± 2 200	0.353	3/3 (100%) Heavily infected, mainly at the fundic region; dilated glands; hyperplasia	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion
	Yes	2 369 ± 1 348		3/3 (100%) Heavily infected, mainly at the fundic glands; hyperplasia	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion	0/3 (0%) Undetected parasite or lesion
<i>C. parvum</i> IOWA ^d	Non	18 136 ± 15 173	0.002	8/14 (57 %) LGIN	8/14 (57 %) Duodenitis, rare parasites	0/14 (0%) Undetected parasite or lesion	0/14 (0%) Undetected parasite or lesion	12/14 (85%) Periportal inflammation with parasite invasion of bile ducts
	Yes	46 153 ± 42 516		3/15 (20%) LGIN 1/15 (7%) HGIN	4/14 (29%) Duodenitis, 1/14 (20%) LGIN 2/14 (14%) HGIN	9/15 (60%) Polyps with LGIN and HGIN associated with numerous parasites.	3/15 (20%) Polyps with LGIN and HGIN associated with numerous parasites.	3/15 (20%) Cholangitis and parasite colonization
<i>C. parvum</i> TUM1 ^{d, e}	Non	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
	Yes	368 117 ± 186 438	-	2/2 (100%) LGIN	2/2 (100%) Numerous parasites in duodenum	2/2 (100%) Polyps with LGIN and HGIN associated with numerous parasites.	0/2 (0%) Undetected parasite or lesion	0/2 (0%) Undetected parasite or lesion

^a Only observations made in SCID mice infected with 10⁵ – 10⁷ oocysts, euthanatized at day 35 post infection or after were considered in this table. ^b Oocyst excretion rate (mean±standard deviation) at the day of euthanasia, usually at day 35 post infection or after for results considered in this table. ^c Oocyst counts on modified Ziehl-Neelsen stained dry slides of mouse stools.

^d Oocyst counts after IMS and IF staining (see 'Materials and Methods'). ^e The low number of mice shown in this group resulted from unexpected high mortality before day 35 post infection. LGIN: Low grade intraepithelial neoplasia, HGIN: High grade intraepithelial neoplasia, ND: Not done

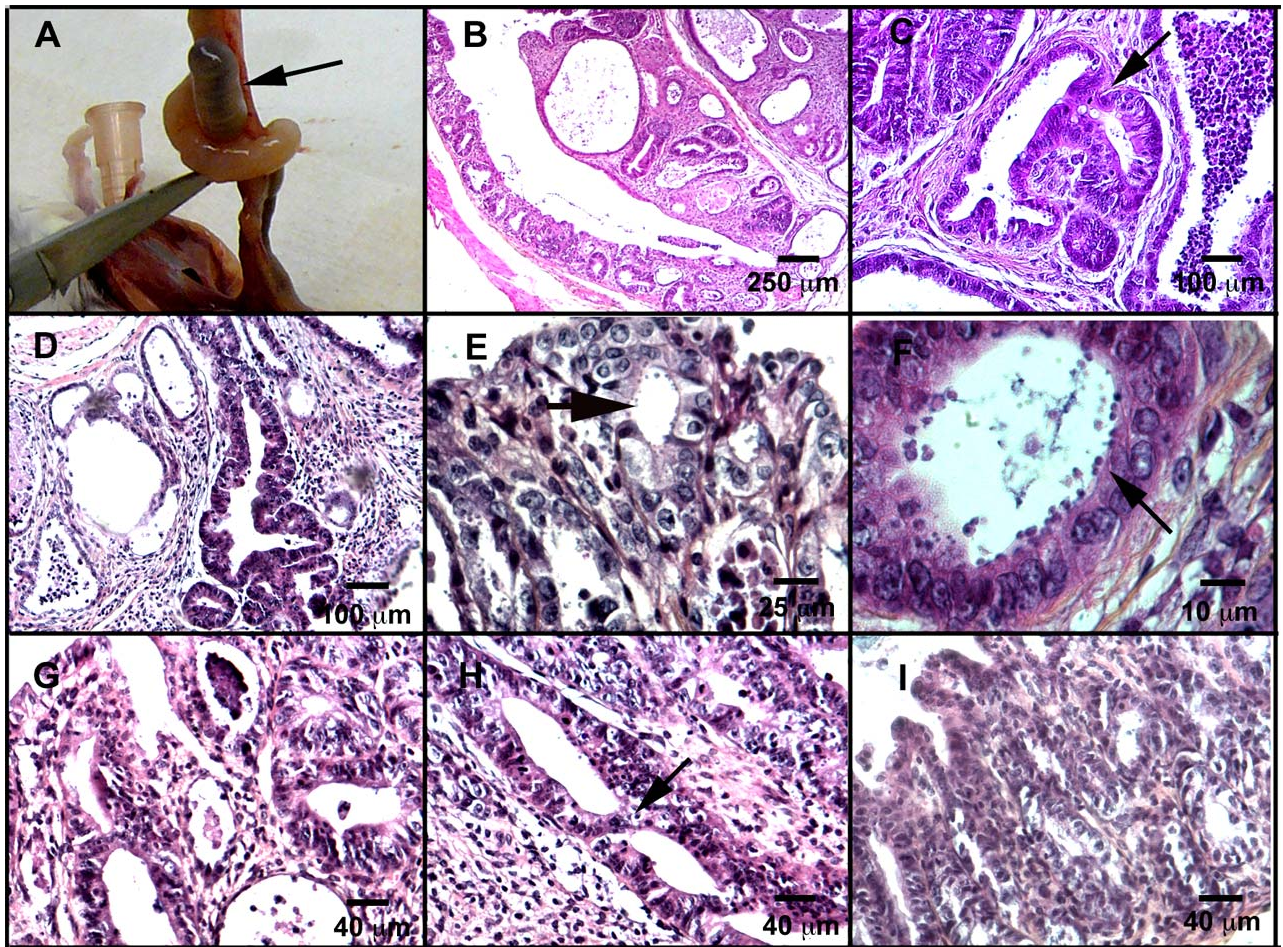


Fig 1. A, Ileocaecal region at necropsy of a Dex-treated SCID mouse infected with 10^5 oocysts of *C. parvum* TUM1 (euthanasia day 42 post-infection). The caecum is enlarged and hemorrhagic (arrow). B and C, Histological sections of the caecum of a Dex-treated SCID mouse infected with 10^5 oocysts of *C. parvum* IOWA strain (euthanasia day 62 post-infection). In Fig. B a projection of a polypoid structure with focal cystic dilation is observed inside the intestinal lumen. In Fig. C, intraepithelial neoplasia of high grade, characterized by architectural distortion of glands and presence of cellular atypias, is observed. D, E, F, Histological sections of the caecum of Dex-treated SCID mice infected with 10^6 oocysts of *C. parvum* TUM1 strain (euthanasia day 39 post-infection). Arrows in Fig. E and F indicate numerous parasites inside the glands. In Fig. F, marked nuclear atypias in a dysplastic lesion are observed. Nuclei are ovoid, placed variably within the cytoplasm, with dense chromatin. G, H, I, Histological sections of Dex-treated SCID mice infected with 10^5 oocysts of *C. parvum* TUM1 strain (euthanasia day 42 post-infection). In Fig G. focal cystic dilation with areas of high grade intraepithelial neoplasia of the caecum is observed. In Fig. H the arrow indicates a zone of fusion of two glands in the caecum mucosa. In Fig. I dysplastic alterations of the stomach are observed: The glands show architectural abnormalities revealing low grade intraepithelial neoplasia (Hematoxylin & Eosin stains).

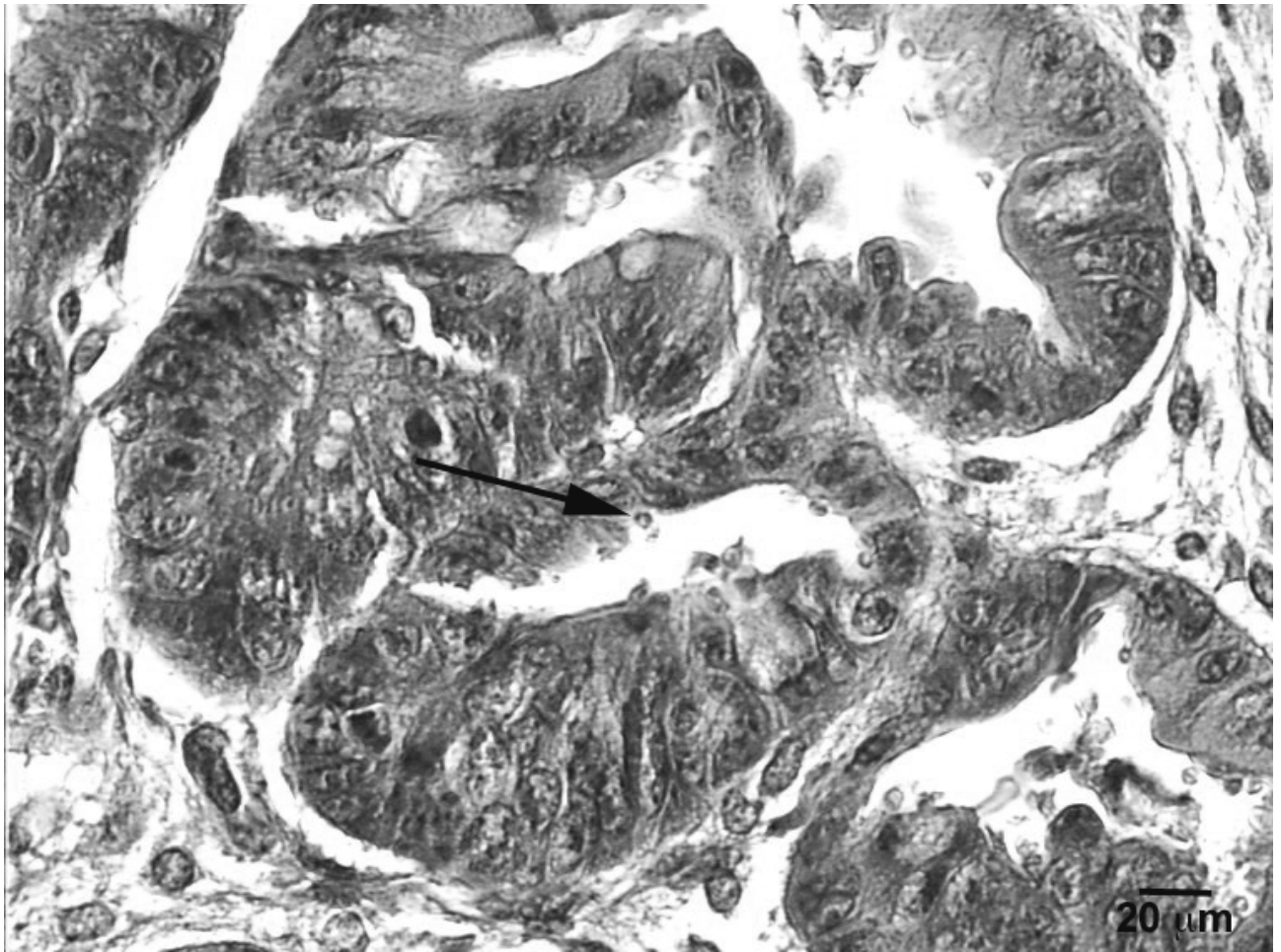


Fig 2. A, Histological section of the ileocaecal region of a Dex-treated SCID mouse infected with 10^5 oocysts of *C. parvum* IOWA (euthanasia day 62 post-infection). Intraepithelial neoplasia of high grade, characterized by architectural distortion of glands and loss of gland differentiation with epithelial atypias consisting of loss of normal polarity, nuclear stratification, prominent nucleoli and irregularly scattered chromatin. Presence of numerous parasites (arrow) inside the glands (Hematoxylin & Eosin stain).

VII. DISCUSSION

1. EPIDEMIOLOGIE DE LA CRYPTOSPORIDIOSE

Afin de discuter les données sur l'épidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose en fonction des différents pays étudiés, celle-ci sont reprises dans les tableaux N° 11 et N° 12.

Tableau N°11. Caractérisation des isolats humains de *Cryptosporidium* selon les pays

	Effectif en fonction du statut immunitaire (nombre de patients)					Espèces de <i>Cryptosporidium</i> associée (GML) [génotype Laxer]				
	VIH+	≤2 ans*	Autres causes d'I.D.	I.C. >2ans	ND	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. canis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. meleagridis</i>
Venezuela	13	1	-	-	-	76,9 % (15)	15,4 % (ND)	7,7 %	0 %	0 %
France	29	6	8	14	-	37 % (19, 9, 15)	48,2 % (30, 28)	0 %	9,2 %	5,5 %
Haïti	31	17	-	3	3	63,3 % (19)	32,7 % (7)	0%	4%	0%
Iran	9	10	-	-	-	26,6 % (ND)	73,3 % (ND) [89% L1 ; 11% L2]	0%	0%	0%

* Dans certains cas, pour les patients ≤2 ans il y avait une condition d'immunodépression associée ;

I.S. : immunodépression ; I.C. : Immunocompétent ; GML : Génotype multiloci prédominant ;

Chiffres en gras: espèce prédominante ; ND: Non déterminé

Tableau N° 12. Caractérisation des isolats animaux de *Cryptosporidium* en France et en Iran

Pays	Veau		Chevreau		Dinde
	Espèce	GML ou sous-génotype	Espèce	GML ou sous-génotype	Espèce
France	<i>C. parvum</i>	27-29	<i>C. parvum</i>	27-29	ND
		25			
		26-28			
		23			
		31-32			
		33-34			
Iran	<i>C. parvum</i>	6/7 sous-génotype L1	ND	ND	2/2 <i>C. meleagridis</i>

GML : Génotype multiloci prédominant

ND: Non déterminé

Les résultats illustrent le fait assez connu que l'impact de la maladie est particulièrement important chez les patients VIH+ et chez les enfants petits. Particulièrement au Venezuela, *Cryptosporidium* sp. a été identifié chez 15 % des infectés par le VIH. L'infection était fortement associée à des taux de lymphocytes CD4+ inférieurs à 100 cellules/mm³, à diarrhée (aigüe ou chronique) et à une perte de poids.

Les espèces les plus communément retrouvées au cours de notre travail ont été *C. parvum* et *C. hominis*, en cohérence avec de nombreuses études qui ont montré que ces deux espèces étaient responsables de la plupart d'infections par *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 2004). Rappelons tout de même que *C. parvum* a longtemps été considérée, à tort, comme la seule espèce responsable de la cryptosporidiose humaine avant que la généralisation des outils moléculaires ne facilite la définition des espèces et ne permette une meilleure connaissance de la taxonomie de ces protozoaires.

Par ailleurs, *C. meleagridis*, *C. felis*, et *C. canis*, trois espèces habituellement associées aux animaux, ont été identifiées chez des patients sidéens (Guyot *et al.*, 2001; Cama *et al.*, 2003; Cama *et al.*, 2007). Guyot *et al* (2001) ont rapporté en France *C. meleagridis* et *C. felis* aussi chez des patients immunocompromis mais VIH négatifs. Nos résultats confirment la

capacité de ces espèces à infecter l'être humain et mettent donc en lumière l'intérêt de leur étude en tant que pathogènes potentiels pour l'homme, d'autant plus que la transmission de ces espèces de personne à personne serait possible (Smith *et al.*, 2007).

Dans les pays européens, *C. parvum* est généralement plus fréquemment identifié que *C. hominis* aussi bien chez les individus immunocompétents que chez les immunodéprimés. Mais dans le reste du monde, *C. hominis* est l'espèce dominante chez les adultes infectés par le VIH ou chez les enfants de moins de 5 ans (Joachim, 2004; Ramirez *et al.*, 2004). Nos résultats sont cohérents avec cette répartition. D'une part, la prédominance en Europe de *C. parvum* chez l'homme suggère que la contamination par contact avec des animaux de ferme joue un rôle important dans la transmission, particulièrement en zone d'élevage. Néanmoins, nos résultats, conformément à ce qui a déjà été rapporté, soulignent l'existence de sous-génotypes de *C. parvum* exclusivement adaptés à l'homme (Xiao & Ryan, 2004; Smith *et al.*, 2007). D'autre part, signalons que *C. hominis* est plutôt une espèce inféodée à l'homme, bien qu'elle infecte expérimentalement d'autres mammifères (Pereira *et al.*, 2002; Baishanbo *et al.*, 2005).

Pour développer une approche de génétique des populations, un marqueur mini-satellite et trois marqueurs micro-satellites sont apparus comme de bons candidats pour notre étude (Aiello *et al.*, 1999; Caccio *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2000; Caccio *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002; Mallon *et al.*, 2003a; Mallon *et al.*, 2003b). Ils ont été retenus en tenant compte deux critères : 1) le critère essentiel voulait que le locus soit amplifiable à la fois pour les principales espèces retrouvées chez l'homme, c'est-à-dire *C. parvum* et *C. hominis*, voire éventuellement, et cela restait à vérifier, pour d'autres espèces; 2) le deuxième critère concernait le degré de polymorphisme allélique au locus considéré, qui devait être le plus élevé.

Par rapport à ce marqueur, nous voudrions rappeler que les approches micro- et mini-satellitaires grâce à leur polymorphisme, constituent un outil puissant pour des études de génétique des populations. Nous avons ainsi pu identifier une structure génétique à prédominance clonale (reproduction avec un faible taux de recombinaison génétique) dans les populations de *Cryptosporidium*. Nous avons de plus observé que l'origine géographique des isolats de *Cryptosporidium* spp. avait un rôle structurant sur les populations du genre. Ainsi, la situation diffère en France où la clonalité est fondamentale (=les clones sont stables dans le temps et dans l'espace) (Tibayrenc, 1995b) et en Haïti, où la clonalité est épidémique (=les clones sont éphémères, répondant à des conditions facilitant l'expansion temporaire de

génotypes spécifiques) (Tibayrenc, 1995b), ce qui pourrait répondre à de multiples facteurs (étendue de l'immunodépression dans les populations humaines, plus forte transmission interhumaine, infrastructures sanitaires déficitaires, insularité). L'espèce hôte joue également un rôle structurant, au point qu'en fonction de l'hôte (humain ou animal) *C. parvum* présente des profils de GML différents. Cette observation suggère, à la faveur des données d'autres auteurs (Alves *et al.*, 2003; Mallon *et al.*, 2003b) l'existence d'une transmission non-zoonotique non négligeable de *C. parvum*. Par ailleurs, l'existence de populations de *C. parvum* ou de sous-types parasitaires adaptés à l'homme s'appuie principalement sur l'analyse du locus GP60 : des sous-types anthroponotiques des familles IIc et IIe ont été retrouvés chez des humains en Afrique du Sud, en Ouganda, au Portugal, aux États-Unis et au Pérou, mais pas chez des animaux (Leav *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004; Xiao & Ryan, 2004; Akiyoshi *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2006). Dans le même sens, les GMLs caractérisant *C. parvum* dans notre étude n'ont été identifiés que parmi des isolats d'origine humaine.

2. NECESSITE D'ASSOCIER L'ETUDE PHENOTYPIQUE AUX ETUDES D'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE

Il nous apparaît essentiel d'associer à l'identification moléculaire l'exploration des propriétés biologiques des populations de *Cryptosporidium*. En effet, dans une perspective de *biologie intégrative*, notre constant souci est d'associer à la caractérisation moléculaire, l'exploration en détail de la biologie des pathogènes. La raison est facile à comprendre: les êtres humains, les animaux sauvages, domestiques et de laboratoire, ne sont pas exposés à des séquences nucléiques intangibles, mais aux organismes parasitaires eux-mêmes, avec leur armement invasif et leur capacité, résultant parfois d'un long processus de co-évolution (Hugot *et al.*, 2003), à synchroniser leur métabolisme avec la physiologie de l'hôte (Smyth, 1994).

Vient alors une autre difficulté majeure de l'étude de l'infection par *Cryptosporidium* : il n'existe pas actuellement de modèle standard. La culture *in vitro* est difficile et ne peut pas être pratiquée en continue. Les modèles animaux présentent chacun des avantages et des inconvénients qui ont empêché d'en adopter un de manière unanime. Le choix d'un modèle peut être guidé par la facilité de sa mise en œuvre. Le modèle murin correspond à ce critère. En revanche, il n'existe pas actuellement de modèle murin permettant d'étudier l'infection par *C. hominis*, espèce inféodée à l'homme et très couramment impliquée dans les cas de

cryptosporidiose humaine. Le modèle gerbille adulte sous immunodépression par administration de glucocorticoïde est sensible à *C. hominis*. Mais, même si une excrétion d'oocystes dans les selles a été obtenue, ce modèle produit une cryptosporidiose asymptomatique, ce qui représente un handicap pour l'étude des manifestations cliniques (Baishanbo *et al.*, 2005). Le modèle porcelet est sensible à *C. hominis* et permet d'obtenir une cryptosporidiose symptomatique avec des manifestations cliniques de légères à modérées (Pereira *et al.*, 2002) mais nécessite pour sa maintenance des installations spéciales et onéreuses. Pour toutes ces raisons nous avons tenté, dans notre laboratoire, de développer un modèle animal reproductible, avec un bon rapport coût-efficacité nous permettant de perpétuer les isolats de *Cryptosporidium* sp, de comparer le comportement des diverses espèces et d'évaluer leurs impacts pathologiques respectifs.

3. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE ANIMAL : POURQUOI LA SOURIS SCID ? POURQUOI LA DEXAMETHASONE ?

Ce travail de thèse a fait le choix d'un modèle murin SCID, souris génétiquement déficiente en lymphocytes T et B qui développent une cryptosporidiose symptomatique (Mead *et al.*, 1994). Pour rendre ces animaux plus sensibles aux espèces identifiées dans les cas de cryptosporidioses humaines, une altération du système immunitaire inné a été ajoutée par administration de Dex. Ce glucocorticoïde est en effet connu pour augmenter la sensibilité à des pathogènes (Rasmussen & Healey, 1992c; Yang & Healey, 1993; Chabé *et al.*, 2004; Baishanbo *et al.*, 2005). Dans nos conditions de travail, quelle que soit la taille de l'inoculum de *Cryptosporidium* employée, les souris non traitées avec la Dex montrent une réponse inflammatoire locale plus importante que ceux recevant le corticoïde. Ce résultat est en cohérence avec des observations qui décrivent (i) une augmentation des niveaux d'Il-15 et de la réponse IFN-gamma pendant la cryptosporidiose conduisant à l'élimination des parasites (Robinson *et al.*, 2001), et (ii) une capacité des corticoïdes à inhiber l'immunité innée et à supprimer l'expression du gène de l'IFN-gamma (Stojadinovic *et al.*, 2007). Dans nos expériences, les souris traitées avec la Dex ont montré une réponse inflammatoire plus modérée et aussi une nette tendance à développer des infections plus graves.

3.1. ESPECES SE DEVELOPPANT DANS CE MODELE

Les souris SCID adultes traitées avec la Dex sont devenues chroniquement infectées par les souches Iowa et TUM1 de *C. parvum*, ainsi que par *C. muris*, avec une excrétion

importante d'oocystes tout au long de l'expérience. Par contre, notre modèle n'est pas susceptible aux espèces *C. hominis* et à *C. molnari*.

C. molnari a été décrit chez des poissons, avec une localisation prédominante dans l'épithélium de l'estomac et plus rarement dans l'intestin (Alvarez-Pellitero & Sitja-Bobadilla, 2002). Dans notre étude, même si les oocystes de *C. molnari* avaient une bonne viabilité avant l'inoculation, l'infection ne s'est pas développée et les parasites n'ont été retrouvés ni dans les selles ni dans les coupes histologiques des animaux infectés. Bien que les rapports phylogénétiques de *C. molnari* avec les autres espèces de *Cryptosporidium* sont inconnus, nous avons supposé que *C. molnari* pouvait avoir un comportement proche de celui des espèces "gastriques" du genre, telles que *C. muris*. C'est avec cette idée que la possibilité de transmission à un mammifère a été testée ici.

C. hominis est considérée comme spécifique de l'homme, donnant une cryptosporidiose anthroponotique. Toutefois, il a été constaté que dans des conditions expérimentales cette espèce peut infecter d'autres animaux comme les porcs gnotobiotiques (Pereira *et al.*, 2002) et les gerbilles adultes sous immunodépression (Baishanbo *et al.*, 2005). Mais des souris immunodéprimées s'étaient déjà montrées réfractaires à cette espèce (Widmer *et al.*, 2000; Akiyoshi *et al.*, 2002).

3.2. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DU MODELE SOURIS SCID SOUS DEXAMETHASONE

Les avantages et les inconvénients du modèle souris SCID sous dexaméthasone sont évoquées dans le tableau N° 13 ci-dessous.

Tableau N° 13. Avantages et inconvénients du modèle souris SCID sous dexaméthasone

Avantages	Inconvénients
Bonne propagation d'isolats parasitaires d'espèces qui se développent chez la souris SCID (p.e. <i>C. parvum</i> et <i>C. muris</i>)	Ce modèle n'est pas sensible à toutes les espèces (p.e. il est réfractaire à <i>C. hominis</i> et <i>C. molnari</i>)
Amplification du nombre d'oocystes: intérêt pour les collections d'isolats (p.e. Collection du Réseau ANOFEL)	Les installations nécessaires pour travailler avec ce modèle sont relativement onéreuses
Excellente reproductibilité: il permet l'étude comparative de l'infection causée par des espèces ou génotypes différents	Fait appel à des compétences multiples (techniciens animaliers expérimentés, parasitologues, anatomo-pathologistes, spécialistes en ultrastructure, expérience en techniques moléculaires de détection et typage)
Infection chronique (=élimination fécale chronique d'oocystes)	Infection souvent asymptomatique
Peut être utilisé pour l'étude de néoplasies digestives	Travail méticuleux, multiplication de groupes de souris contrôle
Le traitement par Dex orale est facile et prend peu temps	Il faut en général ajouter des groupes non-traités par Dex

4. CRYPTOSPORIDIUM ET NEOPLASIE DIGESTIVE

4.1. LES FAITS

Les premiers résultats de l'étude du modèle souris SCID sous Dex ont conduit à la découverte majeure de la capacité de *C. parvum* à induire la formation de polypes iléo-caecaux avec des zones de néoplasie intra-épithéliale de bas et de haut grades. Dans les expériences développées pour confirmer les premières informations, nous nous sommes aperçus que les processus néoplasiques se développaient aussi dans d'autres organes digestifs: estomac, grêle et autres régions du colon. Ces lésions ont été observées 35 jours après l'infection dans l'estomac et après le 45^{ème} jour dans le caecum, lorsque l'infection était devenue chronique.

C. parvum chez la souris SCID se développe habituellement au niveau des entérocytes de l'intestin grêle et du côlon (Mead *et al.*, 1994). Les localisations gastrique et duodénale sont moins souvent décrites. Toutefois, l'infection par *C. parvum* dans l'estomac a été signalée chez l'homme, en particulier chez des patients sévèrement immunodéprimés (Clemente *et al.*, 2000). Dans la présente étude, nous avons trouvé des parasites dans l'estomac des souris SCID, en association avec des lésions néoplasiques chez les animaux

soumis ou pas à la Dex. Mais les lésions les plus graves ont été observées chez les souris sous Dex.

Il est important de mentionner que ces lésions néoplasiques ne sont pas répertoriées parmi les maladies typiques de la souris SCID (Sundberg & Shultz, 1993). De même, une éventuelle contamination de l'inoculum avec des virus ou des procaryotes potentiellement responsables de lésions néoplasiques (p.e. *Helicobacter*) a pu être éliminée (voir les articles N° 5 et 6).

De façon intéressante, *C. muris* n'a pas été associée à ce type de transformation épithéliale et les raisons de ces différences dans l'expression de la maladie ne sont pas claires. Il a été mentionné précédemment une variabilité dans la pathogénicité entre les différents hôtes selon les différentes espèces et variétés infra-spécifiques de *Cryptosporidium*, ce qui suggère l'existence d'une diversité importante de la virulence en fonction des espèces et des isolats (Okhuysen & Chappell, 2002). Cependant, dans notre cas, la divergence entre *C. muris* et *C. parvum*, qui permet à cette dernière de provoquer la transformation néoplasique de l'épithélium, semble ne pas être liée à leur virulence car l'infection par *C. muris*, bien que limitée à l'estomac, a été au moins aussi intense que celle provoquée par *C. parvum*. Pour le moment, donc, la capacité de *C. parvum* à induire la néoplasie digestive semble être une propriété intrinsèque, "qualitative", de cette espèce, et non rattachée à une souche donnée car les deux souches, Iowa et TUM1, ont exprimé l'induction de dysplasie.

En même temps, quand on teste l'effet d'inoculum de taille variable de *C. parvum* on constate que les souris traitées ou pas avec Dex et infectées par 10^6 et 10^7 oocystes développent des infections plus graves que celles inoculées avec 10^5 parasites. En fait, nous avons observé une corrélation nette (Figure N° 3, article N° 6) entre l'intensité de l'infection et la sévérité des modifications histologiques.

Chez les souris contrôles, non infectés, nous avons observé des cellules épithéliales gastro-intestinales normales, alignées le long de la membrane basale et avec des glandes uniformes. Chez les souris infectées par *C. parvum*, nous avons en revanche constaté la présence de lésions dysplasiques au niveau de l'épithélium gastro-intestinal, avec un ensemble d'anomalies architecturales et cytologiques. Les modifications architecturales reposent sur désorganisation des glandes, une réduction du stroma inter-glandulaire, un épaississement de la muqueuse, un allongement et une distorsion des cryptes (Figure N° 4, article N° 5 ; Figure N° 2, article N° 6). Les modifications cellulaires et nucléaires portent sur

des variations de la taille des cellules, augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique, perte de la polarité, hyperchromatisme, sécrétion de mucus généralement absente et un aspect pseudo stratifié, particulièrement notable à la base des cryptes. Des figures mitotiques peuvent apparaître tant au niveau des cellules basales qu'au niveau de l'épithélium de surface, ce qui est anormal. Selon la nomenclature pour la classification de tumeurs gastro-intestinales chez les rongeurs, les tumeurs de ce type correspondent à des lésions de type adénome avec dysplasie ou néoplasie de haut grade (Boivin *et al.*, 2003). Selon la nomenclature de Vienne ces tumeurs correspondent à la catégorie 4 (néoplasie intra-muqueuse de haut grade, sous catégorie 4.2 : carcinome non invasif ou carcinome *in situ*) (Stolte, 2003; Scoazec, 2007).

En plus des anomalies morphologiques, la présence effective de néoplasie dans l'estomac ou dans le caecum a été mesurée à l'aide du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67 (Figure N° 4, article N° 6). L'antigène Ki-67 correspond à une molécule de localisation nucléaire de nature protéique non histone et dont la fonction précise n'a pas encore été totalement élucidée. Il n'est pas détecté dans des cellules quiescentes ou en phase G0, il est en revanche mis en évidence au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Abadi, 2003). Comme l'expression de Ki-67 est spécifique des cellules en division, l'index de marquage a été généralement accepté par la communauté des anatomopathologistes comme une technique fiable d'évaluation de la prolifération cellulaire tumorale. Dans le laboratoire de diagnostic, l'antigène Ki-67 est ainsi considéré comme le meilleur marqueur de prolifération pour une application sur coupes de prélèvements réalisés selon les techniques conventionnelles (Abadi, 2003). De plus, il a été suggéré qu'une topographie anormale du marquage Ki-67 reflète une modification de la prolifération de l'épithélium plutôt liée à la pathogenèse de la néoplasie qu'à des lésions hyperplasiques (Polyak *et al.*, 1996). En fait, selon la nomenclature pour la classification de tumeurs gastro-intestinales chez les rongeurs, dans les processus hyperplasiques de l'épithélium, les cellules en prolifération sont situées dans la partie basale de l'épithélium (Boivin *et al.*, 2003). Dans notre étude, les cellules en prolifération ont également été observées dans la partie haute des glandes et au long de l'épithélium de surface (Shih *et al.*, 2001). Par ailleurs, nos observations avec le Ki-67 ont montré que les modifications histopathologiques commençaient de façon précoce, avant la confirmation histologique de la nature néoplasique des lésions.

4.2. LES HYPOTHESES SUR LES MECANISMES

Même si nous n'avons pas trouvé de lésions tumorales invasives, peut-être en raison de la durée relativement courte des expériences (l'euthanasie a été réalisée au plus tard au jour 84 post-infection), les lésions histologiques décrites ici peuvent être considérées comme des lésions pré-cancéreuses. En effet, dans le processus de tumorigenèse colorectale, une série de modifications de l'épithélium conduisant à l'apparition de cancer a été décrite. Elle comprend des étapes intermédiaires de dysplasie et d'adénome (Luperchio & Schauer, 2001; Jouret & Geboes, 2005). Il apparaît plausible que la détection de lésions définies sous le terme de dysplasie, selon la classification de tumeurs gastro-intestinales des rongeurs (Boivin *et al.*, 2003), ou sous le terme de néoplasie intramuqueuse, selon la classification de Vienne (Stolte, 2003; Scoazec, 2007), soit qu'elle signe la présence concomitante d'un cancer, soit qu'elle prédise son apparition ultérieure (Jouret & Geboes, 2004). En pratique il n'existe pas, du point de vue moléculaire, de différence de nature entre les lésions dysplasiques et les lésions cancéreuses invasives mais une simple différence de degré (Jouret & Geboes, 2004). Dysplasie et cancer désignent des lésions correspondantes à deux stades différents d'un même processus séquentiel (Figure N° 5), aujourd'hui désigné sous le nom de processus néoplasique (Scoazec, 2007). De plus, il est actuellement bien établi par des études épidémiologiques, par des recherches histopathologiques et par des approches moléculaires que la plupart des cancers colorectaux proviennent d'adénomes. Ces lésions sont le siège d'atypies de degrés de sévérité variables (Jouret & Geboes, 2004).

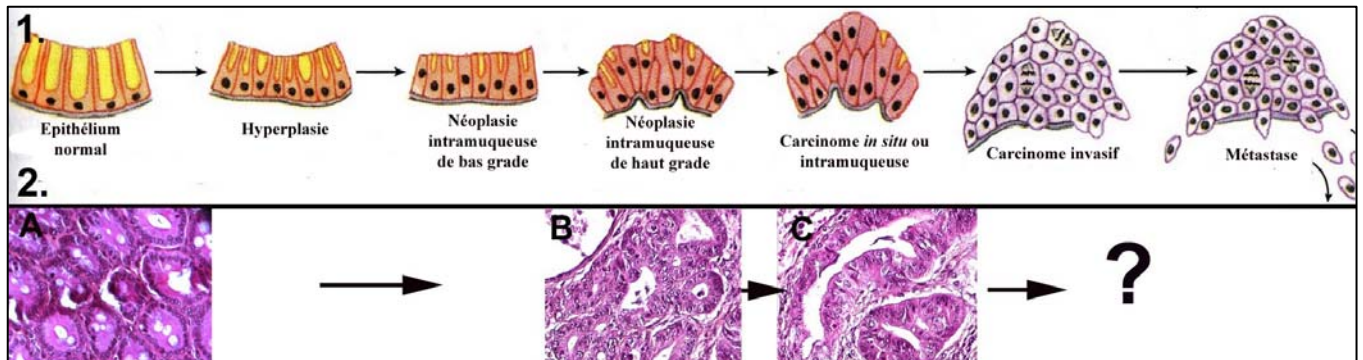


Figure N° 5. Processus de tumorigenèse. 1. Représentation schématique des modifications séquentielles de l'épithélium conduisant à l'apparition de cancer en passant par des étapes intermédiaires (Raven, 2007). 2. Coupes histologiques (coloration hématoxyline – éosine) du caecum de souris SCID. A. Souris témoin. B. Lésion néoplasique intramuqueuse de bas grade chez une souris euthanasiée 46 jours après infection par *Cryptosporidium parvum*. C. Lésion néoplasique intramuqueuse de haut grade chez une souris euthanasiée 57 jours après infection par *Cryptosporidium parvum*.

4.2.1. Cancer et parasites

Plusieurs agents infectieux, y compris les parasites, ont été liés à la cancérogénèse chez l'homme. Certaines de ces associations sont fortes. En particulier, *Schistosoma hematobium* a été décrit comme une cause définitive de cancer de la vessie par l'*International Agency for Research in Cancer*. De plus, une proportion de cholangiocarcinomes dans le monde est imputable à des trématodes Opisthorchiidae (Parkin, 2006). D'autres associations liées à des protozoaires ont été proposées sur la base d'observations épidémiologiques, par exemple l'association entre *Trichomona vaginalis* et le cancer du col de l'utérus, ou *Toxoplasma gondii* et diverses tumeurs (Khurana *et al.*, 2005). De plus, *Helicobacter pylori* a été classée comme oncogène pour l'homme en raison de sa forte association épidémiologique avec le cancer de l'estomac et le lymphome gastrique (Parkin, 2006; Fox & Wang, 2007).

Les parasites du genre *Theileria* sont des protozoaires intracellulaires appartenant au phylum des Apicomplexa. *Theileria annulata* et *Theileria parva* sont deux espèces particulièrement pathogènes pour les bovins et qui provoquent une maladie lymphoproliférative souvent mortelle nommée respectivement la theilériose et la fièvre de la Côte Est. Ensemble, ils sont responsables d'importantes pertes économiques dans les régions endémiques (Dobbelaere *et al.*, 2000). Les leucocytes infectés par *Theileria* présentent les

caractères propres des cellules tumorales, indépendamment du type cellulaire. Ils se multiplient en culture avec un index mitogénique élevé de façon indéfinie et cela, sans ajout de facteurs de croissance. Outre cette capacité de croissance illimitée, les cellules infectées acquièrent un phénotype transformé (Lizundia *et al.*, 2006).

Le mécanisme pathogène de ce parasite a été lié à une inhibition de l'apoptose. Cette inhibition a également été signalée chez d'autres Apicomplexa tels que *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* sp. et *Cryptosporidium* sp. (Heussler *et al.*, 2001). Si les mécanismes d'une induction de néoplasie par l'infection par *Cryptosporidium* restent énigmatiques, quelques pistes seraient à explorer en s'intéressant à la capacité de *C. parvum* à moduler l'apoptose des cellules infectées (McCole *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Mele *et al.*, 2004) et à jouer ainsi un rôle dans la cancérogenèse. Particulièrement, un mécanisme de régulation lié à une modulation du facteur NK-kappaB a été décrit (Heussler *et al.*, 2001).

4.2.2. Virus ?

À fin de tester l'implication d'éventuels contaminants biotiques ou abiotiques dans la solution contenant les oocystes à inoculer, un groupe de souris témoins a été inclus. Les souris de ce groupe ont reçu un volume de suspension d'oocystes correspondant à 10^6 oocystes de *C. parvum* (mais sans oocystes). En effet, avant inoculation, ce volume a été préalablement filtré (Voir 'Matériels et Méthodes') en retenant les oocystes. Aucune atteinte iléo-caecale ni de développement parasitaire n'a été constatée dans ce groupe des souris témoins (Articles N° 5 et 6). De plus, les isolats de *C. parvum* employés dans ce travail proviennent des différentes sources (voir 'Matériels et Méthodes'), ce qui diminue encore les probabilités d'un contaminant spécifique responsable des effets observés.

Par ailleurs, un virus ARN double brin (dsRNA) appartenant à la famille *Patitiviridae* a été retrouvé chez *Cryptosporidium* (*C. parvum* virus : CPV) (Khrantsov *et al.*, 1997; Khrantsov & Upton, 2000; Xiao *et al.*, 2001b). La signification biologique de ce virus est inconnue, mais il est probable qu'il n'ait pas d'effet sur l'hôte comme il a été montré pour les patitivirus en général (Khrantsov *et al.*, 1997). Toutefois, quelques rapports ont décrit une influence du CPV sur le phénotype parasitaire. Ainsi, CPV serait capable d'accroître la virulence et la fécondité des isolats de *C. parvum* (Jenkins *et al.*, 2008).

5. IMPACT POTENTIEL DE NOTRE DECOUVERTE EN SANTE HUMAINE

En Espagne, un adénocarcinome du côlon associé à une cryptosporidiose a été diagnostiqué chez un patient souffrant de diarrhée chronique (Lopez-Velez *et al.*, 1995), et un rôle éventuel de *Cryptosporidium* dans le développement de l'adénocarcinome a été suggéré (Lopez-Velez *et al.*, 1995). Plus récemment une étude épidémiologique en Pologne a signalé 18% de prévalence de cryptosporidiose chez les patients atteints de cancer colorectal (Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007). Parce que *C. parvum* est un agent opportuniste qui cause d'importante morbidité et mortalité chez les patients immunodéprimés, il est possible que les personnes infectées par le parasite aient un risque plus élevé de développer des tumeurs malignes du côlon, en particulier lorsque l'immunosuppression est plus sévère

Particulièrement, le cancer colorectal a été identifié comme une des « *non-AIDS defining malignancies* » avec une incidence de plus en plus élevée chez les patients VIH+ par rapport à la population générale (Yeguez *et al.*, 2003; Bedimo *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2008). Il a été décrit que le cancer colorectal se développe à un âge plus précoce et d'une façon plus agressive quand les patients sont infectés par le VIH (Yeguez *et al.*, 2003). Patel *et al.* dans une étude de cohorte comprenant 54 780 personnes infectées par le VIH ont rapporté dans ce groupe un taux de lymphocytes CD4+ plus bas en association avec la présence de lésions dysplasiques dans le côlon (OR : 6,27, $P = 0,013$), et une incidence de cancer colorectal 2,3 fois plus importante que dans la population générale (Patel *et al.*, 2008).

Le cancer colorectal est une cause importante de morbidité et mortalité dans le monde. Globalement, c'est le quatrième cancer le plus fréquent chez l'homme et le troisième chez la femme (Jouret & Geboes, 2004). Étant donné que l'étiologie du cancer colorectal reste en grande partie inconnue, la découverte d'une association entre l'infection par *C. parvum* et le développement de néoplasie gastro-intestinal semble d'un grand intérêt pour les recherches visant à comprendre le processus de cancérogenèse. Spécialement en considérant que plusieurs agents infectieux, y compris les parasites, ont été liés à la cancérogenèse chez l'homme.

VIII. CONCLUSION

1. Ce travail apporte un modèle expérimental hautement reproductible de cryptosporidiose, fournit des nouvelles informations sur la diversité génétique des *Cryptosporidium* (Alveolata: Apicomplexa) dans plusieurs régions du monde, évalue des différences biologiques entre espèces et démontre, pour la première fois, la capacité de *C. parvum* à induire des processus néoplasiques chez l'hôte immunocompromis. Cette découverte majeure accroît significativement l'intérêt scientifique des *Cryptosporidium* spp et suggère que l'impact de ces parasites en santé humaine et animale pourrait être beaucoup plus grand que ce que l'on croit.
2. Nous avons dans un premier temps cherché à caractériser la variabilité génétique des espèces et de sous-espèces de *Cryptosporidium* en Venezuela, France, Haïti et Iran. Au Venezuela, chez 397 patients avec un statut VIH/SIDA confirmé, notre étude a révélé que l'infection par *Cryptosporidium* est fréquente parmi les patients vivant à Caracas. La prévalence de l'infection augmente avec l'âge, s'associe fréquemment à une diarrhée (plus de 5 selles par jour) et à une perte de poids, un taux de CD4+ <100 cellules/mm³ pouvant être considéré comme un facteur de risque prédictif de cryptosporidiose. La caractérisation génotypique (PCR-RFLP ciblant l'ADNr 18S de *Cryptosporidium* sp.) a permis d'identifier trois espèces de *Cryptosporidium* chez des patients vénézuéliens VIH+: *C. hominis*, *C. parvum* et *C. canis*. Le génotypage multiloci, qui ciblait des mini- et microsatellites, a autorisé une résolution à niveau infra-spécifique. Les échantillons de *C. hominis* présentaient une même combinaison d'allèles.
3. Nous avons effectué des études semblables en France, en Haïti et en Iran. Globalement, la structure génétique des populations des espèces de *Cryptosporidium* montre une prédominance clonale. L'origine géographique et l'espèce hôte ont un rôle structurant. En Iran, trois espèces de *Cryptosporidium*

ont été identifiées parmi les échantillons fécaux de 15 personnes et 9 animaux: *C. parvum*, *C. hominis* et *C. meleagridis*.

4. La seconde partie de ce travail décrit le développement d'un modèle murin immunodéprimé, représenté par des souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency), traitées par la dexaméthasone. Ce modèle, destiné à caractériser les isolats de *Cryptosporidium* spp. sur le plan phénotypique, a révélé des divergences marquées entre *C. parvum* et *C. muris*. L'étude histopathologique a confirmé la localisation gastrique (préférentiellement fundique) de *C. muris*.
5. Les souris SCID sous dexaméthasone inoculées avec *C. parvum* ont développé des dysplasies iléo-caecales de haut grade à partir du 35ème jour post-inoculation. Des néoplasies de haut grade ont été observées aussi au niveau de l'estomac, principalement dans la zone antrale. Globalement, nos expériences ont montré que *C. parvum* induit des néoplasies intra-épithéliales de bas et de haut grade dans l'estomac, le duodénum, le caecum et autres régions du côlon. Un tiers des souris présentaient des lésions néoplasiques dans plus d'un organe. Les espèces *C. hominis*, spécifique de l'homme, et *C. molnari*, du poisson, ne se sont pas développées chez la souris SCID, traitée ou non par la dexaméthasone, tandis que les deux souches de *C. parvum* testées (Iowa et TUM1), se sont bien développées dans notre modèle et les deux induisirent les changements néoplasiques gastro-intestinaux.
6. La relevance potentielle pour la cryptosporidiose humaine des observations rapportées ici chez la souris SCID infectée par *C. parvum* pour la cryptosporidiose humaine devrait maintenant être explorée.

IX. PERSPECTIVES

La définition de marqueurs moléculaires est importante pour le traçage des souches de *Cryptosporidium* sp. et pour la détermination des sources d'infection et des voies de transmission du parasite. Au cours de ce travail, des allèles micro- et mini-satellite connus (Caccio *et al.*, 2001; Mallon *et al.*, 2003b) ont été retrouvés, et des allèles nouveaux ont été détectés et caractérisés. Toutefois, l'ensemble de marqueurs moléculaires utilisé devrait être étoffé pour que l'analyse puisse gagner en résolution. Des loci fortement polymorphes ou d'autres méthodes encore plus discriminantes pourraient être utilisés. En effet, la résolution de la méthode devra être améliorée afin de pouvoir réaliser un génotypage infraspécifique des isolats. Par exemple, le marqueur moléculaire GP60 est celui le plus utilisé à ce jour dans les études sur la variabilité génétique (Chalmers *et al.*, 2005; Akiyoshi *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2006). De plus, il semble nécessaire de trouver des marqueurs capables de caractériser au niveau génotypique d'autres espèces comme par exemple *C. meleagridis* ou *C. felis*.

Par ailleurs, les résultats obtenus par l'étude du modèle SCID-Dex ont montré une association entre l'infection par *C. parvum* et l'induction d'un processus néoplasique fortement reproductible. En effet, il a été possible de confirmer d'une manière systématique la présence du néoplasie entre les jours 35 et 45 post-infection lors de chaque expérience chez les animaux infectés avec *C. parvum*. Il reste maintenant à réaliser une caractérisation fine de ces changements néoplasiques pour aborder l'étude des mécanismes de cette transformation.

Sur le plan expérimental, on peut envisager différentes possibilités d'exploration:

1. Jusqu'à l'heure actuelle, les lésions décrites selon la classification de Vienne sont non invasives, (Stolte, 2003; Scoazec, 2007) et correspondent à un adénocarcinome *in situ*. De manière pratique, ces résultats nécessiteraient d'une évaluation de la capacité de cette lésion de type d'adénocarcinome à progresser localement et à se disséminer vers des secteurs adjacents ou éloignés par mécanismes métastatiques ou autres. La dissémination pourrait être évaluée par un suivi plus prolongé des animaux (au-delà de 84 jours PI) et par une échographie de haute résolution adaptée à de petits animaux. Dans les cas de néoplasies induites par autres agents infectieux comme *Helicobacter pylori*, la

présence de cancer gastrique a été trouvée 18 mois post-infection (Honda *et al.*, 1998)

2. Le modèle expérimental peut être également employé pour évaluer la capacité d'induction de la néoplasie par d'autres espèces de *Cryptosporidium* ou d'autres génotypes isolés à partir d'animaux ou provenant directement de patients.
3. Une question important à clarifier est le rôle du fond génétique de l'hôte dans la survenue de la néoplasie digestive. Pour le moment dans nos travaux nous n'avons utilisé que des souris SCID CB17.
4. Les techniques d'immuno-marquage aident à interpréter et à comprendre les lésions observées à l'examen conventionnel. Elles permettent également d'expliquer les lésions intermédiaires entre la bénignité (états précancéreux ou dysplasies) et la malignité. Parmi ces outils, on retiendra particulièrement l'expression de p53, p21, p27, Bcl2, cycline D1, caspase 3, P16, kératines 8 ou 18. Ces études de marquage, actuellement en cours, se développent parallèlement en immunohistochimie et en Western Blot.
5. Il reste à explorer aussi l'association de *Cryptosporidium* sp. avec néoplasie chez des patients ayant un cancer digestif avéré ou suspecté. En effet, comme cela a déjà été signalé, une incidence élevée de cryptosporidiose a été retrouvée chez des patients atteints de cancer colorectaux (Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007).
6. Il reste aussi l'exploration *in silico* du génome de *C. parvum* déjà séquencé (Abrahamsen *et al.*, 2004), afin d'identifier des gènes de protéines potentiellement impliqués dans la transformation de la cellule hôte à partir de la base de données de protéines liées à la transformation de cellules et à la progression de tumeurs. La valeur véritable d'une séquence génomique ne s'exprime véritablement qu'à travers sa comparaison avec d'autres. L'approche comparative est à la base de l'annotation des génomes, et de la prédiction fonctionnelle des gènes (similarité, conservation de leur position relative, co-évolution, etc.).
7. Une étude du transcriptome/protéome des entérocytes cible pour rechercher l'expression de gènes ou des acteurs protéiques d'une voie de signalisation liés au procès néoplasique, pourrait être envisagée.

X. BIBLIOGRAPHIE

- Abadi, J., 2003. Techniques de detection et de quantification de la proliferation histopathologie animale. *Rev Fr Histotechnol* 16, 45-60.
- Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V., 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304, 441-445.
- Abubakar, I., Aliyu, S.H., Arumugam, C., Usman, N.K., Hunter, P.R., 2007. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 63, 387-393.
- Adams, R.B., Guerrant, R.L., Zu, S., Fang, G., Roche, J.K., 1994. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an *in vitro* model. *J Infect Dis* 169, 170-177.
- Adjei, A.A., Jones, J.T., Enriquez, F.J., Yamamoto, S., 1999. Dietary nucleosides and nucleotides reduce *Cryptosporidium parvum* infection in dexamethasone immunosuppressed adult mice. *Exp Parasitol* 92, 199-208.
- Afssa, 2002. Rapport sur les infections a protozoaires liees aux aliments et a l'eau: evaluation scientifique des risques associés a *Cryptosporidium* sp.
- Aguirre, S.A., Mason, P.H., Perryman, L.E., 1994. Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 62, 697-699.
- Aiello, A.E., Xiao, L., Limor, J.R., Liu, C., Abrahamsen, M.S., Lal, A.A., 1999. Microsatellite analysis of the human and bovine genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryot Microbiol* 46, 46S-47S.
- Akiyoshi, D.E., Feng, X., Buckholt, M.A., Widmer, G., Tzipori, S., 2002. Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. *Infect Immun* 70, 5670-5675.
- Akiyoshi, D.E., Tumwine, J.K., Bakeera-Kitaka, S., Tzipori, S., 2006. Subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from children in Uganda. *J Parasitol* 92, 1097-1100.
- Aliouat, E.M., Dei-Cas, E., Billaut, P., Dujardin, L., Camus, D., 1995. *Pneumocystis carinii* organisms from in vitro culture are highly infectious to the nude rat. *Parasitol Res* 81, 82-85.
- Aliouat, E.M., Martinez, A., Jimenez, E., Dei-Cas, E., Mullet, C., Delcourt, P., Gargallo-Viola, D., 1997. Development of *pneumocystosis* animal models: corticosteroid-treated Wistar rat; SCID mouse and nude rat. *J Eukaryot Microbiol* 44, 41S-42S.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol* 32, 1007-1021.
- Alvarez-Pellitero, P., Quiroga, M.I., Sitja-Bobadilla, A., Redondo, M.J., Palenzuela, O., Padros, F., Vazquez, S., Nieto, J.M., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Light*

- and electron microscope description and histopathological study. *Dis Aquat Organ* 62, 133-145.
- Alves, M., Matos, O., Antunes, F., 2003. Microsatellite analysis of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in Portugal: a preliminary study. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl, 529-530.
- Alves, M., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O., 2006. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitol Res* 99, 287-292.
- Anderson, V.R., Curran, M.P., 2007. Nitazoxanide: a review of its use in the treatment of gastrointestinal infections. *Drugs* 67, 1947-1967.
- Areeshi, M., Dove, W., Papaventsis, D., Gatei, W., Combe, P., Grosjean, P., Leatherbarrow, H., Hart, C.A., 2008. *Cryptosporidium* species causing acute diarrhoea in children in Antananarivo, Madagascar. *Ann Trop Med Parasitol* 102, 309-315.
- Arrowood, M.J., 2002. In vitro cultivation of *cryptosporidium* species. *Clin Microbiol Rev* 15, 390-400.
- Baishanbo, A., Gargala, G., Delaunay, A., Francois, A., Ballet, J.J., Favennec, L., 2005. Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. *Infect Immun* 73, 5252-5255.
- Baishanbo, A., Gargala, G., Duclos, C., Francois, A., Rossignol, J.F., Ballet, J.J., Favennec, L., 2006. Efficacy of nitazoxanide and paromomycin in biliary tract cryptosporidiosis in an immunosuppressed gerbil model. *J Antimicrob Chemother* 57, 353-355.
- Barnes, D.A., Bonnin, A., Huang, J.X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J., Doyle, P., Dubremetz, J.F., Ward, H., Petersen, C., 1998. A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Mol Biochem Parasitol* 96, 93-110.
- Barta, J.R., Thompson, R.C., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol* 22, 463-468.
- Beaudeau, P., de Valk, H., Vaillant, V., Mouly, D., Ledrans, M., Mannschott, C., Tillier, C., 2008. Lessons learned from ten investigations of waterborne gastroenteritis outbreaks, France, 1998-2006. *J Water Health* 6, 491-503.
- Bedimo, R., Chen, R.Y., Accortt, N.A., Raper, J.L., Linn, C., Allison, J.J., Dubay, J., Saag, M.S., Hoesley, C.J., 2004. Trends in AIDS-defining and non-AIDS-defining malignancies among HIV-infected patients: 1989-2002. *Clin Infect Dis* 39, 1380-1384.
- Bern, C., Hernandez, B., Lopez, M.B., Arrowood, M.J., De Merida, A.M., Klein, R.E., 2000. The contrasting epidemiology of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* among outpatients in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 63, 231-235.
- Bhagwandeem, S.B., 1976. Schistosomiasis and carcinoma of the bladder in Zambia. *S Afr Med J* 50, 1616-1620.
- Bird, R.G., Smith, M.D., 1980. Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. *J Pathol* 132, 217-233.
- Boivin, G.P., Washington, K., Yang, K., Ward, J.M., Pretlow, T.P., Russell, R., Besselsen, D.G., Godfrey, V.L., Doetschman, T., Dove, W.F., Pitot, H.C., Halberg, R.B., Itzkowitz, S.H., Groden, J., Coffey, R.J., 2003. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124, 762-777.

- Botteron, C., Dobbelaere, D., 1998. AP-1 and ATF-2 are constitutively activated via the JNK pathway in *Theileria parva*-transformed T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 418-421.
- Boxell, A., Hijjawi, N., Monis, P., Ryan, U., 2008. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. *Exp Parasitol*.
- Caccio, S., Homan, W., Camilli, R., Traldi, G., Kortbeek, T., Pozio, E., 2000. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 120 (Pt 3), 237-244.
- Caccio, S., Spano, F., Pozio, E., 2001. Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Int J Parasitol* 31, 1082-1086.
- Caccio, S.M., Pozio, E., 2006. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4, 429-443.
- Cama, V., Gilman, R.H., Vivar, A., Ticona, E., Ortega, Y., Bern, C., Xiao, L., 2006. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg Infect Dis* 12, 1025-1028.
- Cama, V., Cabrera, L., Lopera, C., Vargas, M., Taquiri, C., Smit, H., Xiao, L., 2008. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and Microsporidia from goats and sheeps in Peru. In: (Ed).[^](Eds.), X Internationak workshops on opportunistic protists (IWOP-10), Vol., Boston, USA, pp.
- Cama, V.A., Bern, C., Sulaiman, I.M., Gilman, R.H., Ticona, E., Vivar, A., Kawai, V., Vargas, D., Zhou, L., Xiao, L., 2003. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl, 531-533.
- Cama, V.A., Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C., Xiao, L., 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis* 196, 684-691.
- Carmen, J.C., Sinai, A.P., 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol Microbiol* 64, 904-916.
- CDC, 1993. From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Jama* 269, 729-730.
- Cersosimo, E., Wilkowske, C.J., Rosenblatt, J.E., Ludwig, J., 1992. Isolated antral narrowing associated with gastrointestinal cryptosporidiosis in acquired immunodeficiency syndrome. *Mayo Clin Proc* 67, 553-556.
- Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R., Ward, H.D., 2000. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect Immun* 68, 4108-4116.
- Chabé, M., Dei-Cas, E., Creusy, C., Fleurisse, L., Respaldiza, N., Camus, D., Durand-Joly, I., 2004. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23, 89-97.
- Chacin-Bonilla, L., Guanipa, N., Cano, G., Raleigh, X., Quijada, L., 1992. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Zulia State, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 47, 582-586.

- Chacin-Bonilla, L., Sanchez-Chavez, Y., 2000. Intestinal parasitic infections, with a special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 62, 347-352.
- Chacin-Bonilla, L., Barrios, F., Sanchez, Y., 2008. Environmental risk factors for *Cryptosporidium* infection in an island from Western Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 45-49.
- Chalmers, R.M., Ferguson, C., Caccio, S., Gasser, R.B., Abs, E.L.O.Y.G., Heijnen, L., Xiao, L., Elwin, K., Hadfield, S., Sinclair, M., Stevens, M., 2005. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int J Parasitol* 35, 397-410.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Sterling, C.R., DuPont, H.L., 1996. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J Infect Dis* 173, 232-236.
- Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 75, 851-857.
- Chaussepied, M., Lallemand, D., Moreau, M.F., Adamson, R., Hall, R., Langsley, G., 1998. Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in *Theileria*-transformed leukocytes. *Mol Biochem Parasitol* 94, 215-226.
- Cheever, A.W., 1978. Schistosomiasis and neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 61, 13-18.
- Chen, X.M., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 1999. *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am J Physiol* 277, G599-608.
- Chen, X.M., Levine, S.A., Splinter, P.L., Tietz, P.S., Ganong, A.L., Jobin, C., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 2001. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* 120, 1774-1783.
- Clemente, C.M., Caramori, C.A., Padula, P., Rodrigues, M.A., 2000. Gastric cryptosporidiosis as a clue for the diagnosis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Arq Gastroenterol* 37, 180-182.
- Current, W.L., Long, P.L., 1983. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *J Infect Dis* 148, 1108-1113.
- Current, W.L., Reese, N.C., 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J Protozool* 33, 98-108.
- Current, W.L., Upton, S.J., Haynes, T.B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool* 33, 289-296.
- Current, W.L., Garcia, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clin Lab Med* 11, 873-897.
- Dalle, F., Roz, P., Dautin, G., Di-Palma, M., Kohli, E., Sire-Bidault, C., Fleischmann, M.G., Gallay, A., Carbonel, S., Bon, F., Tillier, C., Beaudou, P., Bonnin, A., 2003. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *J Clin Microbiol* 41, 2690-2693.

- Darwish, M.A., Raouf, T.A., Rushdy, P., Constantine, N.T., Rao, M.R., Edelman, R., 1993. Risk factors associated with a high seroprevalence of hepatitis C virus infection in Egyptian blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 49, 440-447.
- Datry, A., Sarfati, C., Derouin, F., 2000. Enquete nationale de prevalence des microsporidioses, cryptosporidioses et giardiases. *L'eau, la santé et l'environnement*.
- de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol* 29, 1269-1287.
- de Oliveira-Silva, M.B., de Oliveira, L.R., Resende, J.C., Peghini, B.C., Ramirez, L.E., Lages-Silva, E., Correia, D., 2007. Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/AIDS patients in the Triangulo Mineiro region, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 40, 512-515.
- Dei-Cas, E., Brun-Pascaud, M., Bille-Hansen, V., Allaert, A., Aliouat, E.M., 1998. Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22, 163-168.
- Dei-Cas, E., Verrez-Bagni, V., sous presse. Les produits aquatiques: caracteristiques, transformation, valorisation.
- Derouin, F., 2006-2007. Evaluation de la situation de la cryptosporidiose humaine en France en 2006 et 2007. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* (soumis).
- Dessauge, F., Lizundia, R., Baumgartner, M., Chaussepied, M., Langsley, G., 2005. Taking the Myc is bad for *Theileria*. *Trends Parasitol* 21, 377-385.
- Dobbelaere, D.A., Coquerelle, T.M., Roditi, I.J., Eichhorn, M., Williams, R.O., 1988. *Theileria parva* infection induces autocrine growth of bovine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4730-4734.
- Dobbelaere, D.A., Fernandez, P.C., Heussler, V.T., 2000. *Theileria parva*: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cell Microbiol* 2, 91-99.
- Dobbelaere, D.A., Rottenberg, S., 2003. *Theileria*-induced leukocyte transformation. *Curr Opin Microbiol* 6, 377-382.
- Enemark, H.L., Bille-Hansen, V., Lind, P., Heegaard, P.M., Vigre, H., Ahrens, P., Thamsborg, S.M., 2003. Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*--evaluation of an animal infection model. *Vet Parasitol* 113, 35-57.
- Enriquez, F.J., Sterling, C.R., 1991. *Cryptosporidium* infections in inbred strains of mice. *J Protozool* 38, 100S-102S.
- Fayer, R., Ellis, W., 1993a. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *J Parasitol* 79, 771-774.
- Fayer, R., Ellis, W., 1993b. Glycoside antibiotics alone and combined with tetracyclines for prophylaxis of experimental cryptosporidiosis in neonatal BALB/c mice. *J Parasitol* 79, 553-558.
- Fayer, R., 1997. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokio.
- Fayer, R., Lindsay, D., 1997. Laboratory models of cryptosporidiosis. In: Press, C. (Ed.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, Boca Raton, Fl.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30, 1305-1322.

- Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A., Dubey, J.P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol* 87, 1415-1422.
- Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 126, 37-56.
- Fayer, R., Santin, M., Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol* 91, 624-629.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., Greiner, E., 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol* 135, 105-112.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol*.
- Feltus, D.C., Giddings, C.W., Khaitsa, M.L., McEvoy, J.M., 2008. High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Vet Parasitol* 151, 191-195.
- Feng, X., Rich, S.M., Akiyoshi, D., Tumwine, J.K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Tzipori, S., Widmer, G., 2000. Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. *Appl Environ Microbiol* 66, 3344-3349.
- Feng, X., Rich, S.M., Tzipori, S., Widmer, G., 2002. Experimental evidence for genetic recombination in the opportunistic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 119, 55-62.
- Fox, J.G., Wang, T.C., 2007. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 117, 60-69.
- Galley, Y., Hagens, G., Glaser, I., Davis, W., Eichhorn, M., Dobbelaere, D., 1997. Jun NH2-terminal kinase is constitutively activated in T cells transformed by the intracellular parasite *Theileria parva*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5119-5124.
- Gao, L.Y., Kwai, Y.A., 2000. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8, 306-313.
- Garza, A., Castenillos-Gonzalez, A., Griffiths, J., Robinson, P., 2008. Infection of immunocompetent mice with acid-water-pretreated *Cryptosporidium parvum* results in weight loss, and intestinal (structural and physiological) alterations. *Parasitol Res* 102, 457-463.
- Geurden, T., Thomas, P., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2008. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Vet Parasitol* 155, 142-145.
- Girouard, D., Gallant, J., Akiyoshi, D.E., Nunnari, J., Tzipori, S., 2006. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *J Parasitol* 92, 399-400.
- Gofti-Laroche, I., Schmitt, M., 2003. Epidemies de gastroenterites liees a la pollution du resseau de distribution d'eau potable de la commune de Divonne-les-bains, Ain (01). Aout-Septembre 2003. In: (Ed).[^](Eds.), Institut de Veille sanitaire, Vol., DRASS de Rhone Alpes, CIRE de Rhone Alpes-Auvergne, pp.
- Grinberg, A., Pomroy, W.E., 2007. Appreciate study on *Cryptosporidium* shedding in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 230, 339.
- Guergnon, J., Dessauge, F., Traincard, F., Cayla, X., Rebollo, A., Bost, P.E., Langsley, G., Garcia, A., 2006. A PKA survival pathway inhibited by DPT-PKI, a new specific cell

- permeable PKA inhibitor, is induced by *T. annulata* in parasitized B-lymphocytes. *Apoptosis* 11, 1263-1273.
- Guyot, K., Gireaudot-Liepmann, M.F., Cabon, A., Riveau-Ricard, I., Lange, M., Delattre, J.M., Dei-Cas, E., 2000. Influence Of US Epa 1622 Method Successive Steps On The Viability Of *Cryptosporidium* Oocysts. *Water Science & Technology* 41, 189-196.
- Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelievre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G., Cailliez, J.C., Camus, D., Dei-Cas, E., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J Clin Microbiol* 39, 3472-3480.
- Guyot, K., Ngouanesavanh, T., Dei-Cas, E., 2005. Strategies for detecting pathogenic protists in water: the point on *Cryptosporidium*. *European Journal of water quality* 36, 51-70.
- Guyonnet, J., 1999. Pollution des eaux d'alimentation a Sete, septembre 1998. Rapport finale d'enquete epidemiologique.
- Halim, A.B., Garry, R.F., Dash, S., Gerber, M.A., 1999. Effect of schistosomiasis and hepatitis on liver disease. *Am J Trop Med Hyg* 60, 915-920.
- Hamedi, Y., Safa, O., Haidari, M., 2005. *Cryptosporidium* infection in diarrheic children in southeastern Iran. *Pediatr Infect Dis J* 24, 86-88.
- Hamilton, S.R., Aalfonen, L.A., eds., 2000. Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System. WHO classification of tumours. IARC Press, Lyon.
- Harp, J.A., Wannemuehler, M.W., Woodmansee, D.B., Moon, H.W., 1988. Susceptibility of germfree or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* 56, 2006-2010.
- Harp, J.A., Chen, W., Harmsen, A.G., 1992. Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum*: the importance of intestinal microflora. *Infect Immun* 60, 3509-3512.
- Hashim, A., Clyne, M., Mulcahy, G., Akiyoshi, D., Chalmers, R., Bourke, B., 2004. Host cell tropism underlies species restriction of human and bovine *Cryptosporidium parvum* genotypes. *Infect Immun* 72, 6125-6131.
- Healey, M.C., Yang, S., Rasmussen, K.R., Jackson, M.K., Du, C., 1995. Therapeutic efficacy of paromomycin in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol* 81, 114-116.
- Heine, J., Moon, H.W., Woodmansee, D.B., 1984. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect Immun* 43, 856-859.
- Henriksen, S.A., Pohlenz, J.F., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22, 594-596.
- Heussler, V.T., Machado, J., Jr., Fernandez, P.C., Botteron, C., Chen, C.G., Pearse, M.J., Dobbelaere, D.A., 1999. The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7312-7317.
- Heussler, V.T., Kuenzi, P., Rottenberg, S., 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* 31, 1166-1176.
- Hicks, R.M., Ismail, M.M., Walters, C.L., Beecham, P.T., Rabie, M.F., El Alamy, M.A., 1982. Association of bacteriuria and urinary nitrosamine formation with *Schistosoma*

- haematobium* infection in the Qalyub area of Egypt. Trans R Soc Trop Med Hyg 76, 519-527.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Morgan, U.M., Thompson, R.C., 2001. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. Int J Parasitol 31, 1048-1055.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., Thompson, R.C., 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. Int J Parasitol 34, 769-777.
- Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A., Nasu, M., 1998. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer Res 58, 4255-4259.
- Hoover, D.M., Hoerr, F.J., Carlton, W.W., Hinsman, E.J., Ferguson, H.W., 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Nasu lituratus* Bloch Schneider. J. Fish Dis 4, 425-428.
- Huang, J., Mullapudi, N., Lancto, C.A., Scott, M., Abrahamsen, M.S., Kissinger, J.C., 2004. Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. Genome Biol 5, R88.
- Hugot, J.P., Demanche, C., Barriol, V., Dei-Cas, E., Guillot, J., 2003. Phylogenetic systematics and evolution of primate-derived *Pneumocystis* based on mitochondrial or nuclear DNA sequences comparison. Systematic biology 52, 735-744.
- Hunter, P.R., Hughes, S., Woodhouse, S., Raj, N., Syed, Q., Chalmers, R.M., Verlander, N.Q., Goodacre, J., 2004. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. Clin Infect Dis 39, 504-510.
- Irvin, A.D., Brown, C.G., Kanhai, G.K., Stagg, D.A., 1975. Comparative growth of bovine lymphosarcoma cells and lymphoid cells infected with *Theileria parva* in athymic (nude) mice. Nature 255, 713-714.
- Iseki, M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn. J. Parasitol. 28, 285-307.
- Ivanov, V., Stein, B., Baumann, I., Dobbelaere, D.A., Herrlich, P., Williams, R.O., 1989. Infection with the intracellular protozoan parasite *Theileria parva* induces constitutively high levels of NF-kappa B in bovine T lymphocytes. Mol Cell Biol 9, 4677-4686.
- Izquierdo, J., Antunez, I., Calderon, M.T., Perez Giraldo, C., Munoz Sanz, A., 1988. Diarrhea caused by *Cryptosporidium* and colonic neoplasia. Rev Clin Esp 182, 393-394.
- Jenkins, M.C., O'Brien, C.N., Trout, J.M., 2008. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts by dot-blotting using monoclonal antibodies to *Cryptosporidium parvum* virus 40-kDa capsid protein. J Parasitol 94, 94-98.
- Jirku, M., Valigurova, A., Koudela, B., Krizek, J., Modry, D., Slapeta, J., 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. Folia Parasitol (Praha) 55, 81-94.
- Joachim, A., 2004. Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 51, 251-259.
- Johansen, G.A., Sterling, C.R., 1994. Detection of a prolonged *C. parvum* infection in immunocompetent adult C57BL/6 mice. J Eukaryot Microbiol 41, 45S.

- Jouret, A., Geboes, K., 2004. Dysplasie: néoplasie intraépithéliale et maladies inflammatoires chroniques idiopathiques du colon (MICI). *Acta Endoscopica* 34, 215-227.
- Jouret, A., Geboes, K., 2005. Histopathology of adenomas and early colorectal cancers; what should an endoscopist know about it? *Acta Endoscopica* 35, 607-620.
- Khramtsov, N.V., Woods, K.M., Nesterenko, M.V., Dykstra, C.C., Upton, S.J., 1997. Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Mol Microbiol* 26, 289-300.
- Khramtsov, N.V., Upton, S.J., 2000. Association of RNA polymerase complexes of the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum* with virus-like particles: heterogeneous system. *J Virol* 74, 5788-5795.
- Khurana, S., Dubey, M.L., Malla, N., 2005. Association of parasitic infections and cancers. *Indian J Med Microbiol* 23, 74-79.
- Koudela, B., Modry, D., 1998. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporididae) from lizards. *Folia Parasitol* 45, 93-100.
- Koudela, B., Modry, D., Vitovec, J., 1998. Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet Parasitol* 76, 181-188.
- Kourda, N., Blel, A., Ben Jilani, S.B., Zermani, R., 2008. Gastric cryptosporidiosis revealing a small cell lung carcinoma (Tunisia). *Bull Soc Pathol Exot* 101, 22-23.
- Kuenzi, P., Schneider, P., Dobbelaere, D.A., 2003. *Theileria parva*-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis. *J Immunol* 171, 1224-1231.
- Kuhls, T.L., Mosier, D.A., Abrams, V.L., Crawford, D.L., Greenfield, R.A., 1994. Inability of interferon-gamma and aminoguanidine to alter *Cryptosporidium parvum* infection in mice with severe combined immunodeficiency. *J Parasitol* 80, 480-485.
- Kvac, M., Kvetonova, D., Salat, J., Ditrich, O., 2007a. Viability staining and animal infectivity of *Cryptosporidium andersoni* oocysts after long-term storage. *Parasitol Res* 100, 213-217.
- Kvac, M., Ondrackova, Z., Kvetonova, D., Sak, B., Vitovec, J., 2007b. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet Parasitol* 143, 229-233.
- Laha, T., Pinlaor, P., Mulvenna, J., Sripa, B., Sripa, M., Smout, M.J., Gasser, R.B., Brindley, P.J., Loukas, A., 2007. Gene discovery for the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *BMC Genomics* 8, 189.
- Laxer, M.A., Timblin, B.K., Patel, R.J., 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 45, 688-694.
- Leav, B.A., Mackay, M.R., Anyanwu, A., RM, O.C., Cevallos, A.M., Kindra, G., Rollins, N.C., Bennish, M.L., Nelson, R.G., Ward, H.D., 2002. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect Immun* 70, 3881-3890.
- Leoni, F., Mallon, M.E., Smith, H.V., Tait, A., McLauchlin, J., 2007. Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* isolates from sporadic livestock cases in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 45, 3286-3294.

- Levine, N.D., 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol* 66, 830-834.
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol* 47, 91-95.
- Liu, J., Enomoto, S., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., 2008. Inhibition of Apoptosis in *Cryptosporidium parvum* Infected Intestinal Epithelial Cells is Dependent on Survivin. *Infect Immun*.
- Lizundia, R., Sengmanivong, L., Guernon, J., Muller, T., Schnelle, T., Langsley, G., Shorte, S.L., 2005. Use of micro-rotation imaging to study JNK-mediated cell survival in *Theileria parva*-infected B-lymphocytes. *Parasitology* 130, 629-635.
- Lizundia, R., Chaussepied, M., Huerre, M., Werling, D., Di Santo, J.P., Langsley, G., 2006. c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling promotes survival and metastasis of B lymphocytes transformed by *Theileria*. *Cancer Res* 66, 6105-6110.
- Lopez-Velez, R., Tarazona, R., Garcia Camacho, A., Gomez-Mampaso, E., Guerrero, A., Moreira, V., Villanueva, R., 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14, 677-681.
- Luperchio, S.A., Schauer, D.B., 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect* 3, 333-340.
- Lyra, L.G., Reboucas, G., Andrade, Z.A., 1976. Hepatitis B surface antigen carrier state in hepatosplenic schistosomiasis. *Gastroenterology* 71, 641-645.
- Ma, P., Soave, R., 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis* 147, 824-828.
- Ma, P., 1984. *Cryptosporidium* and the enteropathy of immune deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3, 488-490.
- Ma, P., Kaufman, D.L., Helmick, C.G., D'Souza, A.J., Navin, T.R., 1985. Cryptosporidiosis in tourists returning from the Caribbean. *N Engl J Med* 312, 647-648.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., et al., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 331, 161-167.
- Madwar, M.A., el Tahawy, M., Strickland, G.T., 1989. The relationship between uncomplicated schistosomiasis and hepatitis B infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83, 233-236.
- Mallon, M., MacLeod, A., Wastling, J., Smith, H., Reilly, B., Tait, A., 2003a. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *J Mol Evol* 56, 407-417.
- Mallon, M.E., MacLeod, A., Wastling, J.M., Smith, H., Tait, A., 2003b. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infect Genet Evol* 3, 207-218.
- Mata, L., Bolanos, H., Pizarro, D., Vives, M., 1984. Cryptosporidiosis in children of Costa Rica: a cross section and longitudinal study. *Rev Biol Trop* 32, 129-135.

- Mayer, D.A., Fried, B., 2007. The role of helminth infections in carcinogenesis. *Adv Parasitol* 65, 239-296.
- Mayr, E., 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York, N.Y.
- McCole, D.F., Eckmann, L., Laurent, F., Kagnoff, M.F., 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 68, 1710-1713.
- McDonald, V., Deer, R., Uni, S., Iseki, M., Bancroft, G.J., 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect Immun* 60, 3325-3331.
- Mead, J.R., Humphreys, R.C., Sammons, D.W., Sterling, C.R., 1990. Identification of isolate-specific sporozoite proteins of *Cryptosporidium parvum* by two-dimensional gel electrophoresis. *Infect Immun* 58, 2071-2075.
- Mead, J.R., Arrowood, M.J., Sidwell, R.W., Healey, M.C., 1991. Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. *J Infect Dis* 163, 1297-1304.
- Mead, J.R., Ilksoy, N., You, X., Belenkaya, Y., Arrowood, M.J., Fallon, M.T., Schinazi, R.F., 1994. Infection dynamics and clinical features of cryptosporidiosis in SCID mice. *Infect Immun* 62, 1691-1695.
- Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70, 1156-1160.
- Mele, R., Gomez Morales, M.A., Tosini, F., Pozio, E., 2004. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect Immun* 72, 6061-6067.
- Miller, S.A., Rosario, C.L., Rojas, E., Scorza, J.V., 2003. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health* 8, 342-347.
- Miller, T.A., Schaefer, F.W., 3rd, 2006. Characterization of a single dose methylprednisolone acetate immune suppression model using *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol* 141, 66-83.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A., Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *J Eukaryot Microbiol* 49, 433-440.
- Morrison, W.I., Buscher, G., Murray, M., Emery, D.L., Masake, R.A., Cook, R.H., Wells, P.W., 1981. *Theileria parva*: kinetics of infection in the lymphoid system of cattle. *Exp Parasitol* 52, 248-260.
- Mullapudi, N., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Kissinger, J.C., 2007. Identification of putative cis-regulatory elements in *Cryptosporidium parvum* by de novo pattern finding. *BMC Genomics* 8, 13.
- Naciri, M., 1992. La cryptosporidiose. Importance de la contamination de l'eau. *INRA Prod. Anim.* 5, 319-327.
- Nahrevanian, H., Assmar, M., 2008. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in the Islamic Republic of Iran. *J Microbiol Immunol Infect* 41, 74-77.

- Navin, T.R., Weber, R., Vugia, D.J., Rimland, D., Roberts, J.M., Addiss, D.G., Visvesvara, G.S., Wahlquist, S.P., Hogan, S.E., Gallagher, L.E., Juranek, D.D., Schwartz, D.A., Wilcox, C.M., Stewart, J.M., Thompson, S.E., 3rd, Bryan, R.T., 1999. Declining CD4+ T-lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: results of a 3-year longitudinal study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20, 154-159.
- NCBI, 2008. The NCBI entrez taxonomy homepage: *Cryptosporidium*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Nesterenko, M.V., Woods, K., Upton, S.J., 1999. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. *Biochim Biophys Acta* 1454, 165-173.
- Newman, R.D., Sears, C.L., Moore, S.R., Nataro, J.P., Wuhib, T., Agnew, D.A., Guerrant, R.L., Lima, A.A., 1999. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 180, 167-175.
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592-598.
- Nina, J.M., McDonald, V., Dyson, D.A., Catchpole, J., Uni, S., Iseki, M., Chiodini, P.L., McAdam, K.P., 1992. Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *Cryptosporidium* species. *Infect Immun* 60, 1509-1513.
- Novak, S.M., Sterling, C.R., 1991. Susceptibility dynamics in neonatal BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J Protozool* 38, 103S-104S.
- O'Donoghue, P.J., 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 25, 139-195.
- O.M.S., 2006. Guidelines for drinking-water quality. www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html
- Ogunkolade, B.W., Robinson, H.A., McDonald, V., Webster, K., Evans, D.A., 1993. Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. *Parasitol Res* 79, 385-388.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Jakubowski, W., DuPont, H.L., 1998. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* 66, 441-443.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., DuPont, H.L., 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis* 180, 1275-1281.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet? *Int J Parasitol* 32, 517-525.
- Okhuysen, P.C., Rich, S.M., Chappell, C.L., Grimes, K.A., Widmer, G., Feng, X., Tzipori, S., 2002. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon- γ knockout mice. *J Infect Dis* 185, 1320-1325.
- ONUSIDA, 2008. Rapport 2008 sur l'épidémie mondiale de SIDA. [//www.unaids.org/fr/CountryResponses/Regions/Caribbean.asp](http://www.unaids.org/fr/CountryResponses/Regions/Caribbean.asp)
- Ortega, Y.R., Sheehy, R.R., Cama, V.A., Oishi, K.K., Sterling, C.R., 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. *J Protozool* 38, 40S-41S.

- Ortega, Y.R., Liao, J., 2006. Microwave inactivation of *Cyclospora cayetanensis* sporulation and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Food Prot* 69, 1957-1960.
- Palmer, G.H., Machado, J., Jr., Fernandez, P., Heussler, V., Perinat, T., Dobbelaere, D.A., 1997. Parasite-mediated nuclear factor kappaB regulation in lymphoproliferation caused by *Theileria parva* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12527-12532.
- Panciera, R.J., W., T.R., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol* 8, 479.
- Pape, J.W., Liautaud, B., Thomas, F., Mathurin, J.R., St Amand, M.M., Boncy, M., Pean, V., Pamphile, M., Laroche, A.C., Johnson, W.D., Jr., 1983. Characteristics of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Haiti. *N Engl J Med* 309, 945-950.
- Pape, J.W., Levine, E., Beaulieu, M.E., Marshall, F., Verdier, R., Johnson, W.D., Jr., 1987. Cryptosporidiosis in Haitian children. *Am J Trop Med Hyg* 36, 333-337.
- Parkin, D.M., 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118, 3030-3044.
- Patel, P., Hanson, D.L., Sullivan, P.S., Novak, R.M., Moorman, A.C., Tong, T.C., Holmberg, S.D., Brooks, J.T., 2008. Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. *Ann Intern Med* 148, 728-736.
- Pereira, S.J., Ramirez, N.E., Xiao, L., Ward, L.A., 2002. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *J Infect Dis* 186, 715-718.
- Perez-Schael, I., Boher, Y., Mata, L., Perez, M., Tapia, F.J., 1985. Cryptosporidiosis in Venezuelan children with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 34, 721-722.
- Petry, F., Robinson, H.A., McDonald, V., 1995. Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Clin Microbiol* 33, 1922-1924.
- Pohlenz, J., Bemrick, W.J., Moon, H.W., Cheville, N.F., 1978. Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Vet Pathol* 15, 417-427.
- Polyak, K., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1996. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 149, 381-387.
- Power, M., Ryan, U., 2008. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos *Macropus giganteus*. *J Parasitol*, 1.
- Pozio, E., Morales, M.A., 2005. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol* 21, 58-63.
- Puiu, D., Enomoto, S., Buck, G.A., Abrahamsen, M.S., Kissinger, J.C., 2004. CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic Acids Res* 32, D329-331.
- Raccurt, C.P., Brasseur, P., Verdier, R.I., Li, X., Eyma, E., Stockman, C.P., Agnamey, P., Guyot, K., Totet, A., Liautaud, B., Nevez, G., Dei-Cas, E., Pape, J.W., 2006. Human cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* spp. in Haiti. *Trop Med Int Health* 11, 929-934.
- Ramirez, N.E., Ward, L.A., Sreevatsan, S., 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect* 6, 773-785.
- Ramsay, D.B., Long, S.E., Ali, M.A., Entwisle, C., Orenstein, J.M., Rossi, C., Borum, M.L., 2007. Isolated gastric cryptosporidiosis in an immunocompetent patient. *Dig Dis Sci* 52, 1364-1366.

- Rasmussen, K.R., Healey, M.C., 1992a. Dehydroepiandrosterone-induced reduction of *Cryptosporidium parvum* infections in aged Syrian golden hamsters. *J Parasitol* 78, 554-557.
- Rasmussen, K.R., Healey, M.C., 1992b. *Cryptosporidium parvum*: experimental infections in aged Syrian golden hamsters. *J Infect Dis* 165, 769-772.
- Rasmussen, K.R., Healey, M.C., 1992c. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect Immun* 60, 1648-1652.
- Rasmussen, K.R., Healey, M.C., Cheng, L., Yang, S., 1995. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol* 81, 429-433.
- Raven, P., 2007. *Biologie*. de Boeck. 1^{ère} édition.
- Rhee, J.K., So, W.S., Kim, H.C., 1999. Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *Korean J Parasitol* 37, 33-37.
- Riggs, M.W., Stone, A.L., Yount, P.A., Langer, R.C., Arrowood, M.J., Bentley, D.L., 1997. Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *J Immunol* 158, 1787-1795.
- Riggs, M.W., McNeil, M.R., Perryman, L.E., Stone, A.L., Scherman, M.S., O'Connor, R.M., 1999. *Cryptosporidium parvum* sporozoite pellicle antigen recognized by a neutralizing monoclonal antibody is a beta-mannosylated glycolipid. *Infect Immun* 67, 1317-1322.
- Rim, H.J., 2005. Clonorchiasis: an update. *J Helminthol* 79, 269-281.
- Ripert, C., Guyot, K., 2003. Cryptosporidiose. In: *Epidémiologie des maladies parasitaires* Vol. 3, pp. 269-297. Edition Médicales Internationales.
- Rivasi, F., Rossi, P., Righi, E., Pozio, E., 1999. Gastric cryptosporidiosis: correlation between intensity of infection and histological alterations. *Histopathology* 34, 405-409.
- Robinson, P., Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Lewis, D.E., Shahab, I., Lahoti, S., White, A.C., Jr., 2001. Expression of IL-15 and IL-4 in IFN-gamma-independent control of experimental human *Cryptosporidium parvum* infection. *Cytokine* 15, 39-46.
- Rosin, M.P., Saad el Din Zaki, S., Ward, A.J., Anwar, W.A., 1994. Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutat Res* 305, 283-292.
- Rossi, P., Pozio, E., Besse, M.G., Gomez Morales, M.A., La Rosa, G., 1990. Experimental cryptosporidiosis in hamsters. *J Clin Microbiol* 28, 356-357.
- Rossi, P., Rivasi, F., Codeluppi, M., Catania, A., Tamburrini, A., Righi, E., Pozio, E., 1998. Gastric involvement in AIDS associated cryptosporidiosis. *Gut* 43, 476-477.
- Roulston, A., Marcellus, R.C., Branton, P.E., 1999. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 53, 577-628.
- Ryan, U.M., Xiao, L., Read, C., Sulaiman, I.M., Monis, P., Lal, A.A., Fayer, R., Pavlasek, I., 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J Parasitol* 89, 809-813.

- Ryan, U.M., Monis, P., Enemark, H.L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson, R.C., Xiao, L., 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). J Parasitol 90, 769-773.
- Ryan, U.M., Bath, C., Robertson, I., Read, C., Elliot, A., McInnes, L., Traub, R., Besier, B., 2005. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. Appl Environ Microbiol 71, 4992-4997.
- Ryan, U.M., Power, M., Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). J Eukaryot Microbiol 55, 22-26.
- Sallon, S., Deckelbaum, R.J., Schmid, II, Harlap, S., Baras, M., Spira, D.T., 1988. *Cryptosporidium*, malnutrition, and chronic diarrhea in children. Am J Dis Child 142, 312-315.
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. Vet Parasitol 122, 103-117.
- Santin, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet Parasitol 155, 15-23.
- Scoazec, J.Y., 2007. Dysplasie en muqueuses glandulaires digestives: nouvelles terminologies, nouvelles classifications. Ann Pathol 27, 398-416.
- Seydel, K.B., Stanley, S.L., Jr., 1996. SCID mice and the study of parasitic disease. Clin Microbiol Rev 9, 126-134.
- Sherwood, D., Angus, K.W., Snodgrass, D.R., Tzipori, S., 1982. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. Infect Immun 38, 471-475.
- Shih, I.M., Wang, T.L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S.R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 2001. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 2640-2645.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J Comp Pathol 65, 262-266.
- Smith, A., Reacher, M., Smerdon, W., Adak, G.K., Nichols, G., Chalmers, R.M., 2006. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. Epidemiol Infect 134, 1141-1149.
- Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R.A., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Vet Parasitol 149, 29-40.
- Smyth, J., 1994. Introduction to animal parasitology. Cambridge University Press, New York.
- Sneath, P.H., Sokal, R.R., 1962. Numerical taxonomy. Nature 193, 855-860.
- Soulez, B., Dei-Cas, E., Camus, D., 1988. The rabbit, experimental host of *Pneumocystis carinii*. Ann Parasitol Hum Comp 63, 5-15.
- Spano, F., Putignani, L., Guida, S., Crisanti, A., 1998. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. Exp Parasitol 90, 195-198.
- Sripa, B., Kaewkes, S., Sithithaworn, P., Mairiang, E., Laha, T., Smout, M., Pairojkul, C., Bhudhisawasdi, V., Tesana, S., Thinkamrop, B., Bethony, J.M., Loukas, A., Brindley, P.J., 2007. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. PLoS Med 4, e201.

- Steele, M.I., Kuhls, T.L., Nida, K., Meka, C.S., Halabi, I.M., Mosier, D.A., Elliott, W., Crawford, D.L., Greenfield, R.A., 1995. A *Cryptosporidium parvum* genomic region encoding hemolytic activity. *Infect Immun* 63, 3840-3845.
- Stojadinovic, O., Lee, B., Vouthounis, C., Vukelic, S., Pastar, I., Blumenberg, M., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2007. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem* 282, 4021-4034.
- Stolte, M., 2003. The new Vienna classification of epithelial neoplasia of the gastrointestinal tract: advantages and disadvantages. *Virchows Arch* 442, 99-106.
- Striepen, B., Pruijssers, A.J., Huang, J., Li, C., Gubbels, M.J., Umejiego, N.N., Hedstrom, L., Kissinger, J.C., 2004. Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3154-3159.
- Strong, W.B., Gut, J., Nelson, R.G., 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immun* 68, 4117-4134.
- Sulzyc-Bielicka, V., Kuzna-Grygiel, W., Kolodziejczyk, L., Bielicki, D., Kladny, J., Stepień-Korzonek, M., Telatynska-Smieszek, B., 2007. Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. *J Parasitol* 93, 722-724.
- Sundberg, J.P., Shultz, L.D., 1993. The Severe Combined Immunodeficiency (scid) Mutation. *JAX NOTES* 453.
- Sunnotel, O., Lowery, C.J., Moore, J.E., Dooley, J.S., Xiao, L., Millar, B.C., Rooney, P.J., Snelling, W.J., 2006. *Cryptosporidium*. *Lett Appl Microbiol* 43, 7-16.
- Tanriverdi, S., Markovics, A., Arslan, M.O., Itik, A., Shkap, V., Widmer, G., 2006. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Appl Environ Microbiol* 72, 2507-2513.
- Taxonomicon 2008. www.taxonomy.nl/taxonomicon
- Templeton, T.J., Iyer, L.M., Anantharaman, V., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Subramanian, G.M., Hoffman, S.L., Abrahamsen, M.S., Aravind, L., 2004a. Comparative analysis of apicomplexa and genomic diversity in eukaryotes. *Genome Res* 14, 1686-1695.
- Templeton, T.J., Lancto, C.A., Vigdorovich, V., Liu, C., London, N.R., Hadsall, K.Z., Abrahamsen, M.S., 2004b. The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect Immun* 72, 980-987.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J., 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2414-2418.
- Tibayrenc, M., 1995a. Population genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III* 318, 135-139.
- Tibayrenc, M., 1995b. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* 36, 47-115.
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28, 85-104.

- Tyzzer, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic gland of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 5, 12.
- Tyzzer, E.E., 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (ge.et sp.nov.) of the gastric gland of the common mouse. *J Med Res* 23, 487-509.
- Tyzzer, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd* 26.
- Tzipori, S., Widmer, G., 2008. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol* 24, 184-189.
- Uhl, E.W., Jacobson, E., Bartick, T.E., Micinilio, J., Schimdt, R., 2001. Aural-pharyngeal polyps associated with *Cryptosporidium* infection in three iguanas (*Iguana iguana*). *Vet Pathol* 38, 239-242.
- Ungar, B.L., Gilman, R.H., Lanata, C.F., Perez-Schael, I., 1988. Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. *J Infect Dis* 157, 551-556.
- Ungar, B.L., Burris, J.A., Quinn, C.A., Finkelman, F.D., 1990. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. *Infect Immun* 58, 961-969.
- Ungar, B.L., Kao, T.C., Burris, J.A., Finkelman, F.D., 1991. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J Immunol* 147, 1014-1022.
- Upton, S.J., Gillock, H.H., 1996. Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* in ICR outbred suckling mice. *Folia Parasitol (Praha)* 43, 101-106.
- Valigurova, A., Jirku, M., Koudela, B., Gelnar, M., Modry, D., Slapeta, J., 2008. Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int J Parasitol* 38, 913-922.
- Ventura, G., Cauda, R., Larocca, L.M., Riccioni, M.E., Tumbarello, M., Lucia, M.B., 1997. Gastric cryptosporidiosis complicating HIV infection: case report and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9, 307-310.
- Vernes, A., Dei-Cas, E., 1978. *Encyclopédie Médico-chirurgicale. Maladies Infectieuses.* Paris.
- Vetterling, J.M., Jervis, H.R., Merrill, T.G., Sprinz, H., 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J Protozool* 18, 243-247.
- Vitovec, J., Koudela, B., 1988. Location and pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* in experimentally infected mice. *Zentralbl Veterinarmed B* 35, 515-524.
- Vitovec, J., Koudela, B., Vladik, P., Hausner, O., 1991. Interaction of *Cryptosporidium parvum* and *Campylobacter jejuni* in experimentally infected neonatal mice. *Zentralbl Bakteriologie* 274, 548-559.
- Vitovec, J., Koudela, B., 1992. Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. *Vet Parasitol* 43, 25-36.
- Widmer, G., Akiyoshi, D., Buckholt, M.A., Feng, X., Rich, S.M., Deary, K.M., Bowman, C.A., Xu, P., Wang, Y., Wang, X., Buck, G.A., Tzipori, S., 2000. Animal propagation

- and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. Mol Biochem Parasitol 108, 187-197.
- Willcox, H.P., Coura, J.R., 1991. The efficiency of Lutz, Kato-Katz and Baermann-Moraes (adapted) techniques association to the diagnosis of intestinal helminths. Mem Inst Oswaldo Cruz 86, 457-460.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Appl Environ Microbiol 65, 3386-3391.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A., 2001a. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J Infect Dis 183, 492-497.
- Xiao, L., Limor, J., Bern, C., Lal, A.A., 2001b. Tracking *Cryptosporidium parvum* by sequence analysis of small double-stranded RNA. Emerg Infect Dis 7, 141-145.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev 17, 72-97.
- Xiao, L., Ryan, U.M., 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Curr Opin Infect Dis 17, 483-490.
- Xiao, L., Fayer, R., 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int J Parasitol 38, 1239-1255.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G.A., 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. Nature 431, 1107-1112.
- Yang, S., Healey, M.C., 1993. The immunosuppressive effects of dexamethasone administered in drinking water to C57BL/6N mice infected with *Cryptosporidium parvum*. J Parasitol 79, 626-630.
- Yang, S., Healey, M.C., Du, C., 1996. Infectivity of preserved *Cryptosporidium parvum* oocysts for immunosuppressed adult mice. FEMS Immunol Med Microbiol 13, 141-145.
- Yeguez, J.F., Martinez, S.A., Sands, D.R., Sands, L.R., Hellinger, M.D., 2003. Colorectal malignancies in HIV-positive patients. Am Surg 69, 981-987.
- Zali, M.R., Mehr, A.J., Rezaian, M., Meamar, A.R., Vaziri, S., Mohraz, M., 2004. Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. Jpn J Infect Dis 57, 268-270.

XI. ANNEXES

Travaux présentés aux congrès scientifiques internationaux

IX International Workshops on opportunistic protists (IWOP-9). June 2006. Hotel Villa Rica, Lisbon, Portugal

First Molecular Data on Cryptosporidiosis in Venezuela,

G. CERTAD^{1,2}, T. NGOUANESAVANH¹, A. HERNAN², E. ROJAS², R. CONTRERAS³, L. POCATERRA², L. NUÑEZ², E. DEL-CAS^{1,4}, K. GUYOT¹

¹ Ecologie du Parasitisme, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 59 019, Lille, France ; ² Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina “José María Vargas”, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ³ Sección de Geohelminthiasis, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ⁴ Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, France

There is not much information about circulation and transmission of cryptosporidiosis in developing countries in which this disease remains as a clinically significant opportunistic infection, especially in those HIV infected persons without access to HAART. In this study we included 37 HIV infected patients from different regions of Venezuela. They underwent thorough clinical history and provided stool specimens for the diagnosis of *Cryptosporidium* sp and other parasites. Genomic DNA was isolated from positive faecal samples for *Cryptosporidium*. A highly polymorphic section of the 18SrRNA gene was amplified by nested PCR, different species of the parasite were identified by RFLP and confirmed by sequencing. Analysis of micro (ML1, ML2, MS9) and minisatellite (MS5) markers was performed when possible. *Cryptosporidium* sp was found in 10 patients, all these patients were coming from urban communities, they had an advanced stage of immunosuppression, and only 2 persons were beginning HAART. Three genotypes were identified: eight isolates corresponded to *C. hominis*, one to *C. parvum* and another one to *C. canis*. For all *C. hominis* samples analyzed by micro and minisatellite markers, we found the same combination of alleles (same multilocus genotype). Patients with *C. hominis* were all symptomatic adults with diarrhoea either acute or chronic. On the other hand, *C. parvum* was detected in one child of two years old, asymptomatic for cryptosporidiosis, and *C. canis* was found in a 73-year old woman with chronic diarrhoea as her first manifestation of AIDS. This patient confirmed during the epidemiological questionnaire that she owned dogs at the current moment. This is the first molecular data on molecular cryptosporidiosis in this country. These preliminary results, suggest that *C. hominis* is the predominant species among HIV infected patients in Venezuela but also species from animals can infect Venezuelan patients and may be linked to clinical disease.

6ème Journée « Andre Verbert ». Colloque annuel des doctorants. 27 septembre 2006. Polytech'Lille (USTL-Lille1)

Epidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose humaine et animale au Venezuela: caractérisation moléculaire et phénotypique des espèces et variétés infra-spécifiques du genre *Cryptosporidium*

Introduction: Le genre *Cryptosporidium* comprend des espèces qui infectent l'intestin d'un grand nombre de vertébrés, y compris l'homme. Ils sont la cause de la cryptosporidiose, maladie opportuniste émergente avec un impact considérable chez les patients immunodéprimés, notamment sidéens. Ces protistes infectent aussi des sujets immunocompétents dans toutes les latitudes, et peuvent provoquer des diarrhées en général autorésolutives. De plus, la morphologie étant insuffisante à la distinction des espèces de ce genre, leur identification, qui fait appel à des méthodes moléculaires, est rarement pratiquée. Cependant, elle constitue le seul moyen de déterminer les sources, les voies et les mécanismes de l'infection, informations essentielles au développement de stratégies rationnelles de prévention. Les buts de cette étude sont de déterminer le génotype ainsi que les caractéristiques phénotypiques des populations parasitaires de *Cryptosporidium* sp. au Venezuela. Rien à propos de ces facteurs n'est connu au Venezuela où la prévalence de l'infection symptomatique ou asymptomatique par *Cryptosporidium* dans les écoles primaires peut dépasser 50% d'après des données récentes. **Matériel et méthodes:** Pour l'étude génotypique des prélèvements fécaux d'origine humaine diagnostiqués positifs pour *Cryptosporidium* par microscopie, une PCR-RFLP ciblant l'ADNr 18S a permis la caractérisation au niveau de l'espèce de l'isolat parasite, puis un génotypage à des loci mini- et microsatellites, plus polymorphes, a autorisé une résolution à un niveau infra-spécifique. L'évaluation phénotypique des isolats se fait d'une part *in vivo*, avec l'utilisation de modèles murins (inoculation de différentes espèces *Cryptosporidium* à des souris SCID), et d'autre part *in vitro*, avec des cellules épithéliales intestinales humaines (co-culture de différentes espèces de *Cryptosporidium* dans un système de cellules HCT-8). **Résultats:** Trois espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées parmi les échantillons fécaux de 10 patients vénézuéliens VIH+: 8 *C. hominis*, 1 *C. parvum*, 1 *C. canis*. L'analyse avec les marqueurs mini- et microsatellites a révélé que les échantillons de *C. hominis* présentaient la même combinaison d'allèles. Ces résultats s'étoffent au fur et à mesure de l'arrivée de nouveaux échantillons de Venezuela. Les résultats des études phénotypiques sont actuellement en cours et seront développés le jour de la communication.

Epidémiologie moléculaire de la cryptosporidiose au Venezuela: caractérisation moléculaire et phénotypique des espèces

CERTAD Gabriela Directrice de thèse; DURIEZ Thérèse
Laboratoire Ecologie et Parasitisme-EA3609, Institut Pasteur de Lille

Introduction

Le genre *Cryptosporidium* comprend des espèces qui infectent l'intestin d'un grand nombre de vertébrés, y compris l'homme. Ils sont la cause de la cryptosporidiose, maladie opportuniste émergente avec un impact considérable chez les patients immunodéprimés, notamment sidéens. Si ce parasite est bien connu depuis longtemps, des questions fondamentales restent à élucider.

Problèmes

1. **Taxonomie**: l'identification des espèces et des variants est difficile.
2. **Epidémiologie**: les sources d'infection restent obscures.
3. **Pathologie**: les mécanismes physiopathologiques restent à clarifier.

A) Etudes épidémiologiques

Stratégies

B) Modèle expérimental

A.1) Etude clinique-épidémiologique au Venezuela

Matériels et méthodes: 397 patients vénézuéliens VIH/SIDA (1997-2002). Lors du recrutement, l'historique clinique et les résultats de tests de laboratoire ont été collectés. Chaque patient a fourni 3 échantillons fécaux. *Cryptosporidium* a été diagnostiqué par microscopie optique (coloration de Kinyoun).

Résultats:

Table 1. Caractéristiques cliniques des patients étudiés

Sexe	Cryptosporidiose		p	
	Groupes	Témoin		
Masculin	53/59 (89.8%)	293/338 (86.7%)	0.505	
Féminin	6/59 (10.2%)	45/338 (13.3%)		
Age	<35 ans	16/56 (28.6%)	157/318 (49.4%)	0.004*
	≥35 ans	40/56 (71.4%)	161/318 (50.6%)	
Diarrhée	56/59 (94.9%)	248/338 (73.4%)	<0.001*	
Nb de selles par jour	<5	7/26 (26.9%)	42/78 (53.8%)	0.017*
	≥5	19/26 (73.1%)	36/78 (46.2%)	
Perte de poids	26/59 (44.1%)	95/338 (28.1%)	0.014*	
Lymphocytes CD4+	≥ 100	14/33 (42.4%)	115/185 (62.2%)	0.034*
	<100	19/33 (57.6%)	70/185 (37.8%)	

* Seuil de significativité: P < 0.05. Certad et al. Am J Trop Med Hyg. 2003 Jul;73(1):54-7

A.2) Etude de l'épidémiologie moléculaire

Matériels et méthodes: De nouveaux prélèvements fécaux vénézuéliens d'origine humaine diagnostiqués positifs pour *Cryptosporidium* par microscopie ont été collectés. Une PCR-RFLP ciblant l'ADNr 18S a permis la caractérisation au niveau de l'espèce de l'isolat parasitaire.

Résultats:

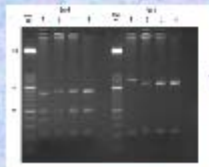


Figure 1. RFLP (Restriction fragment length polymorphism patterns) pour identifier les espèces de *Cryptosporidium* de quatre adultes VIH/SIDA après amplification du gène de l'ARNr 18S par PCR, nichée et digestion avec *Ssp I* et *Ase I*.

Table 2. Distribution de *Cryptosporidium* sp.

Espèces	Spécimens N	Diarrhée N
<i>C. hominis</i>	8 adultes	8/8
<i>C. parvum</i>	1 enfant	0/1
<i>C. canis</i>	1 adulte	1/1
Total	10	9/10

Certad et al. Journal of Eukaryotic Microbiology, sous presse

Comportement d'isolats de *Cryptosporidium* chez la souris SCID

Matériels et méthodes: Pour comparer les manifestations histologiques chez la souris SCID dans différentes conditions d'immunosuppression et selon l'espèce de *Cryptosporidium* inoculée, différents groupes ont été établis:

Table 3. Groupes de souris SCID étudiés

	<i>C. parvum</i> 10 ⁶ oocystes inoculés par gavage gastrique	<i>C. muris</i> 10 ⁶ oocystes inoculés par gavage gastrique	Aucun parasite
Sans dexaméthasone	6 P	6 M	3 T
Dexaméthasone 4 mg/L eau de boisson	6 PD	6 MD	3 TD

Résultats:

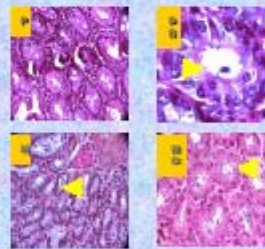


Figure 2. Etude anatomopathologique (coloration hématoxyline-éosine-séifin). P. Région iléocœcale sans présence de parasites (40x). PD. Région iléocœcale avec haut niveau d'infection (100x). M et MD. Présence des parasites à niveau de l'isthme (40x).

Conclusions

La prévalence de la cryptosporidiose chez les patients VIH/SIDA au Venezuela est de 15%. La majorité des patients ont de la diarrhée. L'infection est plus fréquente chez les patients avec un taux de CD4+ < 100 cel/mm³.

C. hominis est l'espèce la plus communément retrouvée chez l'homme. Il existe aussi une transmission zoonotique.

Les souris SCID traitées ou non par dexaméthasone ont développé l'infection. *C. muris* avait une localisation gastrique, tandis que celle de *C. parvum* était entérique. La réponse inflammatoire était faible dans les deux cas. Des différences marquées ont été observées entre les groupes P et PD au niveau du parasitisme de la région iléocœcale qui sont à l'étude actuellement.

Potential role of *Cryptosporidium parvum* in the development of gastro-intestinal cancer

Gabriela Certad*^{1,2}, Tramy Ngouanesavanh*¹, Karine Guyot¹, Nausicaa Gantois¹, Thierry Chassat³, Anthony Mouray³, Nicolas Flament³, Laurence Fleurisse⁴, Anthony Pinon⁵, Laurence Delhaes^{1,6}, Eduardo Dei-Cas^{1,6} and Colette Creusy⁴

¹Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), Institut Pasteur de Lille, Lille, France, ²Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela, ³Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, France, ⁴Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille, France, ⁵Unité de Sécurité Microbiologique, Institut Pasteur de Lille, France, ⁶Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, France

It has been difficult to find suitable animal models for propagation of *Cryptosporidium* strains. We developed an animal model using SCID mice infected with *Cryptosporidium parvum* or *muris* while treated or not with dexamethasone. It was found that *C. parvum* was associated with the formation of polyps and adenocarcinoma lesions in the caecum of dexamethasone treated mice. To further characterize this association between *C. parvum* and gastro-intestinal cancer, SCID mice treated with dexamethasone were challenged with different doses of *C. parvum* and euthanatized periodically after infection, for histological examination. Ki-67 was used as a marker of cellular proliferation. Our previous findings were confirmed using differently sized inoculums of *C. parvum*. Dexamethasone treated mice infected with higher inoculums experienced severe infections associated with neoplasia, observed not only in the caecum but also in the stomach and duodenum of most infected animals. Ki-67 immunohistochemical staining confirmed the neoplastic process associated to cryptosporidiosis, and showed that abnormal proliferation begins very early. In summary, we found a correlation between the intensity of *Cryptosporidium* infection and the progression of the lesions towards neoplasia. We confirmed that *Cryptosporidium parvum* causes gastro-intestinal neoplasia in SCID mice. Ki-67 showed that histopathological alterations begin very early in this neoplastic process associated to cryptosporidiosis.

Experimental *Cryptosporidium*-induced Digestive Neoplasia

Gabriela Certad^{1,2}, Tramy Ngouanesavanh¹, Karine Guyot¹, Nausicaa Gantois¹, Thierry Chassat³, Anthony Mouray³, Nicolas Flament³, Laurence Fleurisse⁴, Anthony Pinon⁵, Laurence Delhaes^{1,6}, Eduardo Dei-Cas^{1,6} and Colette Creusy⁴

¹Ecologie du Parasitisme (EA3609 Université de Lille 2), IFR 142, Institut Pasteur de Lille, Lille, France, ²Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela, ³Plateau d'Expérimentation Animale, Institut Pasteur de Lille, France, ⁴Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l'Université Catholique de Lille, France, ⁵Unité de Sécurité Microbiologique, Institut Pasteur de Lille, France, ⁶Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Université de Lille 2, France

Efforts are still needed to develop reproducible animal models allowing both routine passage of *Cryptosporidium* species, and approaching unclear aspects of cryptosporidiosis. In this double perspective, we compared chronic *muris* and *parvum* infection using SCID mice orally infected with oocysts of *C. muris* versus *C. parvum* oocysts, respectively, and treated with 4mg/L of dexamethasone via the drinking water. *C. muris* infection seemed not to be influenced by dexamethasone. Mice remained infected and did shed oocysts all over the experiment until euthanasia (13th week). In contrast, *C. parvum* infection was markedly enhanced by dexamethasone. These mice shed also *C. parvum* oocysts until euthanasia. But the most impressive result was the observation of *C. parvum* induced low or high grade neoplasia in the digestive tract of either dexamethasone-treated or untreated SCID mice. All dexamethasone-treated SCID mice euthanatized after the 46th day post-infection developed caecal polyps with areas of intra-epithelial neoplasia and *in situ* adenocarcinoma. In addition, some dexamethasone-untreated SCID mice developed also gastric or duodenal low or high grade neoplastic changes. Adenocarcinomatous lesions were also recorded in the stomach of some dexamethasone-untreated *C. parvum*-infected SCID mice. The severity of the neoplastic process was correlated with *C. parvum* development. These observations have been confirmed in other experiments in which Ki67 proliferation marker was used. It is not known if *C. parvum* is able to induce neoplastic lesions in humans but a recent paper reported unexpected high *Cryptosporidium* infection prevalence in European patients with colo-rectal cancer.