



HAL
open science

Etude des interactions entre amibes libres et *Cryptosporidium* spp.

Marion Lefebvre

► **To cite this version:**

Marion Lefebvre. Etude des interactions entre amibes libres et *Cryptosporidium* spp.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR086 . tel-04621969

HAL Id: tel-04621969

<https://theses.hal.science/tel-04621969>

Submitted on 24 Jun 2024

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Étude des interactions entre amibes libres et *Cryptosporidium* spp.

Présentée et soutenue par
Marion LEFEBVRE

Thèse soutenue publiquement le 16 décembre 2022
devant le jury composé de

M. Frédéric GRENOUILLET	Professeur des Universités, Université de Franche-Comté, Besançon	Rapporteur
Mme Estelle PERRAUD	Professeur des Universités, Université de Poitiers	Rapporteur
Mme Nathalie KAPEL	Professeur des Universités, Université Paris V, Université Paris-Descartes	Examinateur
M. Damien COSTA	Maître de conférences, Université de Rouen Normandie	Examinateur
M. Loïc FAVENNEC	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mme Isabelle VILLENA	Professeur des Universités, Université de Reims Champagne-Ardenne	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par les Professeurs Loïc FAVENNEC et Isabelle VILLENA, EA7510 ESCAPE :
épidémiosurveillance et circulation des parasites dans les environnements

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury :

À Monsieur le Professeur Frédéric Grenouillet. À Madame le Professeur Estelle Perraud : Vous me faites l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mes remerciements les plus sincères.

À Madame le Professeur Nathalie Kapel : Vous me faites l'honneur d'examiner ce travail. Je vous en remercie très sincèrement.

À mes directeurs de thèse :

À Monsieur le Professeur Loïc Favennec : Loïc, je te remercie d'avoir accepté de me prendre dans ton équipe. J'ai toujours adoré la parasitologie grâce à toi et à ta façon si passionnée de dispenser tes cours. Merci de m'avoir soutenue dans mes annonces personnelles et de m'avoir aidée à avancer dans ma vie professionnelle. Je suis fière d'avoir pu travailler avec toi et d'avoir appris plein de choses à tes côtés tant sur la parasitologie que sur d'autres sujets.

À Madame le professeur Isabelle Villena : Je vous remercie d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Damien Costa, mon encadrant : Je ne sais quoi dire à part un énorme MERCI. Merci de m'avoir proposé ce sujet, d'avoir été toujours si disponible, si bienveillant, si compréhensif. Tu as toujours su comment m'encourager et m'aider quand il le fallait. J'ai appris tant de choses avec toi et je suis fière d'avoir été ta première « thésarde ».

Je tiens également à remercier :

Les Drs Ludovic Galas, Magalie Bénard et Damien Schapman de PRIMACEN ainsi que le Dr Arnaud François et Damien Genty du service d'anatomopathologie du CHU de Rouen pour leur aide dans toute la partie microscopie. Le Pr Christine Imbert et le Dr Vincent Delafont du Laboratoire Écologie et biologie des interactions de Poitiers pour nous avoir fourni les souches ATCC d'amibes libres.

Tous les membres du laboratoire EA7510 : À Romy, merci pour ta disponibilité et tes conseils. Merci à Venceslas, Abdel et à tous les stagiaires qui m'ont aidé dans l'avancement de cette thèse (Lucie, Gaéтан et Léonie). À Sophie, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris et tout ton soutien. Tu m'as grandement manqué cette année et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites dans ton coin si éloigné de nous.

Les laboratoires de parasitologie/Mycologie et d'Hygiène hospitalière de l'IBC du CHU de Rouen pour m'avoir accueillie ponctuellement ou pour quelques mois.

Le DPIAS : Merci au Professeur Véronique Merle et au Docteur Hélène Marini de m'avoir acceptée dans leur service alors que je n'avais pas encore terminé ma thèse d'université. Merci pour votre gentillesse, merci de me permettre d'apprendre tant de choses à vos côtés. Merci au Docteur Agnès Cottalorda et à Stéphanie, Delphine, Mélanie, Sandrine, Tristan et Ève, merci pour votre accueil si bienveillant, vous être vraiment une équipe au top.

Enfin je tiens à remercier :

Mes parents, Martine et Pascal, qui m'ont toujours soutenue, encouragée, remotivée quand il le fallait. Je vous en ai fait vivre des choses, mais je peux dire que grâce à vous et à votre soutien sans faille, j'y suis enfin arrivée. Merci d'être des parents et grands-parents si présents, merci pour tout. Vincent, Charlotte, Lubin... merci pour tous ces moments passés ensemble et je sais qu'il y en aura encore tellement d'autres avec nos enfants qui se suivent et qui j'espère grandiront ensemble. Suzanne, ma grand-mère avec qui j'ai tant de souvenirs, la vie fait que nous nous voyons moins mais j'ai toujours une pensée pour toi surtout lors d'événements importants pour moi. Mes beaux-parents, Martine et Thierry, merci d'être toujours présents lorsque nous en avons besoin et merci de me supporter depuis quelques années maintenant.

Milan : Voilà bientôt dix ans que nos chemins sont liés. Je suis fière de tout ce que nous avons construit tous les deux et tout ce qui nous reste à construire tous les quatre. Même si ces derniers temps n'ont pas été de tout repos au niveau professionnel pour tous les deux, je sais que tu me soutiens et que nous réussirons à trouver notre équilibre et que nous pourrons ainsi avancer dans d'autres projets ...

Mes Enfants : À vous mes petits garçons, Marin et Andrea, que j'ai vu grandir tout au long de cette thèse et dont je suis si fière d'avoir à mes côtés. Je vous aime tant, vous et vos deux petits caractères déjà bien affirmés.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des tableaux	5
Liste des figures	7
Abréviations	11
Introduction	13
Revue de la littérature	16
1 <i>Cryptosporidium</i>	17
1.1 Historique	17
1.2 Taxonomie	18
1.3 Espèces	19
1.1 Cycle	21
1.2 Transmission	22
1.3 Morphologie	25
1.4 Pouvoir pathogène	27
1.4.1 Doses infectantes	27
1.4.2 Facteurs de virulence	28
1.4.3 Clinique	29
1.4.4 Facteurs de risque	32
1.5 Diagnostic	33
1.6 Détection dans l'eau et les matrices alimentaires	34
1.7 Évaluation de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes	35
1.8 Traitements	37
1.8.1 Symptomatique et curatif.....	37
1.8.2 Prophylaxie	39
1.9 Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> spp.	39
1.9.1 Chez l'Homme.....	39
1.9.2 Chez les animaux.....	42
1.9.3 Prévalence dans l'environnement	43
1.10 Épidémiologie	44
1.10.1 Épidémies liées à l'eau	47
1.10.2 Épidémies alimentaires.....	49
1.11 Résistances des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	50
1.11.1 Facteurs influençant la survie des oocystes dans l'environnement	50
1.11.2 Résistance aux traitements de désinfection de l'eau	55

2	Amibes libres	60
2.1	Définition	60
2.2	Histoire	61
2.3	Taxonomie.....	62
2.4	Morphologie.....	63
2.4.1	Les trophozoïtes.....	64
2.4.2	Les kystes.....	66
2.5	Enkystement/ Désenkystement.....	67
2.5.1	Enkystement.....	67
2.5.2	Désenkystement.....	68
2.6	Reproduction des amibes libres.....	70
2.7	Locomotion des amibes libres	71
2.8	Nutrition.....	71
2.8.1	Pinocytose.....	71
2.8.2	Phagocytose	71
2.9	Pathogénicité directe	73
2.9.1	Les kératites amibiennes	74
2.9.2	Encéphalite amibienne granulomateuse (EAG)	76
2.9.3	Méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP).....	78
2.9.4	Autres pathologies.....	79
2.9.5	Immunité	79
2.10	Pathogénicité indirecte	80
2.10.1	Interactions amibes libres/bactéries et leurs implications en pathologie humaine	80
2.10.2	Mécanismes de résistance à la prédation amibienne	83
2.10.3	Relation entre les amibes libres et les macrophages.....	86
2.11	Intérêt de l'étude des amibes libres	88
2.11.1	Culture des amibes libres.....	88
2.11.2	Intérêt d'utiliser les amibes libres comme modèle d'étude	88
2.12	Prévalence amibienne	90
2.13	Résistance des amibes libres.....	93
2.13.1	Facteurs influençant la survie des amibes libres dans l'environnement.....	93
2.13.2	Effets de traitements de désinfection de l'eau sur la survie des amibes libres..	96
3	Biofilms	99
3.1	Généralités sur les biofilms.....	99
3.2	Biofilm et amibes libres.....	101
3.3	Biofilm et <i>Cryptosporidium</i> spp.	101
	Problématique et objectifs de la thèse.....	110

Matériels et méthodes	111
1 Souches utilisées.....	112
1.1 Les oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	112
1.2 Les amibes libres.....	112
1.3 Souches bactériennes.....	113
1.4 Les lignées cellulaires HCT-8 et Caco-2.....	113
2 Étude des interactions entre amibes libres et <i>C. parvum</i> ou <i>C. hominis</i> en planctonique et en biofilm.	114
2.1 En planctonique.....	114
2.2 En biofilm.....	115
2.3 Dénombrement des oocystes	115
2.4 Évaluation de la survie des amibes libres.....	115
2.5 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> et de <i>C. hominis</i>	116
2.6 Imageries	117
2.6.1 Microscopie confocale.....	117
2.6.2 Vidéo	118
2.6.3 Microscopie Électronique à Transmission (MET).....	118
3 Évaluation de l'effet de traitements de désinfection	119
3.1 Évaluation des interactions chimiques entre <i>C. parvum</i> et <i>A. castellanii</i>	119
4 Analyses statistiques.....	120
Résultats et Discussion.....	121
Étude des interactions entre <i>C. parvum</i> et amibes libres en planctonique et en biofilm.....	122
1 Interactions between free living amoebae and <i>Cryptosporidium parvum</i> in both planktonic and biofilm conditions.....	122
2 Résultats complémentaires	140
2.1 En condition planctonique	140
2.1.1 Interactions entre <i>V. vermiformis</i> et <i>C. parvum</i>	140
2.1.2 Interactions entre <i>A. castellanii</i> et <i>C. parvum</i>	144
2.2 En condition biofilm.....	146
2.2.1 Évaluation de la survie de <i>V. vermiformis</i> avec et sans <i>C. parvum</i>	146
2.2.2 Dénombrement des oocystes de <i>C. parvum</i> avec et sans <i>V. vermiformis</i>	147
2.2.3 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i>	148
2.2.4 Microscopie confocale.....	149
2.2.5 Synthèse des résultats en condition planctonique et biofilm.....	151
2.2.6 Évaluation de la phagocytose amibienne.....	152
2.3 Résultats additionnels : découverte de mécanismes d'échanges inter-amibiens	156

Étude des interactions entre <i>C. hominis</i> et amibes libres en conditions planctonique et de biofilm.....	159
1 Résultats.....	159
1.1 Adaptation de la méthode d'évaluation de l'infectiosité <i>in vitro</i>.....	159
1.2 En condition planctonique	160
1.2.1 Évaluation de la survie et de l'enkystement des amibes libres	160
1.2.2 Dénombrement des oocystes de <i>C. hominis</i>	164
1.2.3 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de <i>C. hominis</i>	165
1.3 En condition biofilm.....	167
1.3.1 Évaluation de la survie et de l'enkystement des amibes libres	167
1.3.2 Dénombrement des oocystes de <i>C. hominis</i>	171
1.3.3 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de <i>C. hominis</i>	172
1.4 Synthèse des résultats en condition planctonique et de biofilm.....	174
2 Discussion	176
Étude de l'effet de traitements de désinfection sur les mélanges <i>C. parvum</i> et amibes libres.....	178
1 Résultats.....	178
1.1 But de l'étude.....	178
1.2 Évaluation de l'effet de traitements de désinfection sur la survie et l'enkystement des amibes libres.....	178
1.2.1 Abattement des amibes libres	178
1.2.2 Enkystement des amibes libres	182
1.3 Évaluation de l'effet des traitements de désinfection sur les oocystes de <i>C. parvum</i>.....	185
1.3.1 Sur l'abattement des oocystes de <i>C. parvum</i>	185
1.3.2 Sur l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i>	187
2 Discussion	189
Conclusions et Perspectives	190
Bibliographie	190

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison entre <i>Cryptosporidium</i> et grégarines.....	18
Tableau II : Principales espèces de <i>Cryptosporidium</i> retrouvées chez les humains et chez les mammifères domestiques	19
Tableau III : répartition des cas de cryptosporidiose infantile entre les espèces <i>Cryptosporidium hominis</i> et <i>Cryptosporidium parvum</i> chez les enfants dans les pays en développement	20
Tableau IV : Infection à <i>Cryptosporidium</i> et caractéristiques cliniques chez des volontaires infectés expérimentalement sans preuve d'anticorps anti- <i>cryptosporidium</i> préexistants.....	27
Tableau V : Thérapies utilisées dans le traitement de la cryptosporidiose en France entre 2017 et 2019.....	37
Tableau VI : Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> dans les aliments.....	44
Tableau VII: effet des températures ambiantes sur la viabilité et l'infectiosité des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	51
Tableau VIII: Effets de la chaleur sur la viabilité et l'infectiosité des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	51
Tableau IX: Effets des basses températures sur la viabilité et l'infectiosité des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	52
Tableau X: efficacité, exprimée en réduction logarithmique décimale, des différentes étapes de traitement de l'eau concernant l'élimination de <i>Cryptosporidium</i> sp. et <i>Gardia</i> sp. en fonction de la turbidité en sortie d'étape de traitement.....	55
Tableau XI : Effets du chlore libre sur l'inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	56
Tableau XII : Effet de lu Dioxyde de chlore sur l'inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> . 57	57
Tableau XIII : Effet de l'ozone sur l'inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	58
Tableau XIV: Dose de rayons UV (mJ/cm ²) nécessaires pour une inactivation des kystes de <i>Gardia</i> et des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> pouvant atteindre 4 log ₁₀ (99,99 %).....	59
Tableau XV: Effet de traitements thermiques sur la survie de <i>Vermamoeba vermiformis</i>	94
Tableau XVI: Effet de traitements thermiques sur la survie d' <i>Acanthamoeba</i> spp.	95
Tableau XVII: Effet du chlore sur <i>Vermamoeba vermiformis</i>	96
Tableau XVIII: Effet du chlore sur <i>Acanthamoeba</i> spp.....	97
Tableau XIX: Synthèse des interactions entre les oocystes de <i>C. parvum</i> et le comportement d' <i>A. castellanii</i> ou de <i>V. vermiformis</i> au cours du temps.....	151

Tableau XX : Synthèse des interactions entre les oocystes de <i>C. parvum</i> et <i>A. castellanii</i> ou <i>V. vermiformis</i> sur la concentration et l'infectiosité des oocystes au cours du temps.	151
Tableau XXI : Synthèse des interactions entre les oocystes de <i>C. hominis</i> et le comportement d' <i>A. castellanii</i> ou de <i>V. vermiformis</i> au cours du temps.....	174
Tableau XXII : Synthèse des interactions entre les oocystes de <i>C. hominis</i> et <i>A. castellanii</i> ou <i>V. vermiformis</i> sur la concentration et l'infectiosité des oocystes au cours du temps.	175

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie de <i>Cryptosporidium</i>	21
Figure 2: Cycle environnementale de <i>C. parvum</i>	23
Figure 3: Distribution mondiale des infections à <i>Cryptosporidium hominis</i> chez les animaux	24
Figure 4: Morphologie d'un oocyste de <i>Cryptosporidium</i> en microscopie électronique à balayage	26
Figure 5 : Sporozoïtes de <i>Cryptosporidium parvum</i> observés en microscopie à contraste interférentiel différentiel	26
Figure 6: Facteurs de virulence de <i>Cryptosporidium</i> décrits et leur contribution au cycle de vie du parasite	28
Figure 7: Microscopie électronique à balayage de <i>Cryptosporidium</i> dans la muqueuse bronchique humaine	30
Figure 8: Répartition des cas confirmés de cryptosporidiose pour 100 000 habitants, par âge et par sexe, en UE/EEE	32
Figure 9: Oocystes de <i>Cryptosporidium</i> observés en microscopie.	34
Figure 10 : Evolution de l'incidence de la cryptosporidiose, chez les patients infectés par le VIH par années ou semestres	38
Figure 11: distribution des cas confirmés de cryptosporidiose pour 100 000 habitants par pays en Europe en 2018)	41
Figure 12: Distribution des cas confirmés de cryptosporidiose par mois en Europe entre 2014 et 2018.....	46
Figure 13: distribution annuelle des cas de cryptosporidiose en France entre 2017 et 2019	47
Figure 14: Distribution globale des épidémies de cryptosporidiose et de giardiose d'origine hydrique rapportées dans le monde	48
Figure 15: première illustration d'une amibe.....	61
Figure 16: structure cellulaire d'une amibe libre.....	64
Figure 17: Trophozoïte d' <i>A. castellanii</i>	65
Figure 18 : Morphologie des trophozoïtes de <i>Vermamoeba vermiformis</i>	65
Figure 19: Kystes du genre <i>Acanthamoeba</i> en microscopie à contraste d'interférence.	66
Figure 20 : kystes de <i>V. vermiformis</i>	67
Figure 21: Observation au microscope électronique à balayage des changements morphologiques d' <i>A. castellanii</i> durant le processus d'enkystement.	68

Figure 22: Étapes du désenkystement d' <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> observées en microscopie optique.....	69
Figure 23 : Étapes de désenkystement de <i>Vermamoeba vermiformis</i> par microscopie électronique à balayage.....	70
Figure 24: Représentation schématique de la phagocytose amibienne	72
Figure 25: Cycle de vie d' <i>Acanthamoeba</i> spp.	73
Figure 26: Oeil normal et œil infecté par <i>Acanthamoeba</i> avec de graves lésions cornéennes et une perte de vision	75
Figure 27: coupe coronale des hémisphères cérébraux avec nécrose corticale et sous-corticale d'un cas humain fatale d'AEG.....	77
Figure 28: microscopie électronique à transmission montrant un trophozoites d' <i>A. castellanii</i> et un macrophage alvéolaire.....	87
Figure 29: observation d'un macrophage (A) et d' <i>A. polyphaga</i> (B) infectés par <i>L. pneumophila</i> en microscopie électronique.....	87
Figure 30: Schéma présentant la formation d'un biofilm bactérien	99
Figure 31 : Dénombrement de <i>V. vermiformis</i> en co-incubation avec de oocystes de <i>C. parvum</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique	140
Figure 32: Proportion d'enkystement de <i>Vermamoeba vermiformis</i> avec et sans oocystes de <i>C. parvum</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique	141
Figure 33 : Dénombrement des oocystes de <i>C. parvum</i> en co-incubation avec <i>V. vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique	142
Figure 34: Evaluation de l'infectiosité des oocystes <i>C. parvum</i> en présence de <i>V. vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique.....	143
Figure 35: Dénombrement des oocystes de <i>C. parvum</i> avec et sans <i>A. castellanii</i> selon une cinétique de temps rapprochée en condition planctonique par microscopie optique.	144
Figure 36 : Infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> après 3 heures de co-incubation avec <i>A. castellanii</i> physiquement séparés par un insert par CC-qPCR.....	145
Figure 37: Dénombrement de <i>V. vermiformis</i> en co-incubation avec de oocystes de <i>C. parvum</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique	146
Figure 38 : Dénombrement des oocystes de <i>C. parvum</i> en co-incubation avec <i>V. vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique	147
Figure 39 : Evaluation de l'infectiosité des oocystes <i>C. parvum</i> en présence d' <i>A. castellanii</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR.	148
Figure 40 : Evaluation de l'infectiosité des oocystes <i>C. parvum</i> en présence de <i>Vermamoeba vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR.....	149

Figure 41 : (A) oocystes de <i>C. parvum</i> (vert) et <i>V. vermiformis</i> (gris) observés après 1h de co-incubation dans un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en microscopie confocale.	150
Figure 42 : Observation en n=5 d'oocystes de <i>C. parvum</i> (vert par marquage au Cryptocell ®) et de trophozoites d' <i>A. castellanii</i> (gris par marquage du matériel génétique au DAPI et traitement informatique).....	153
Figure 43 : Observation en n=5 d'oocystes de <i>C. parvum</i> (vert par marquage au Cryptocell ®) et de trophozoites de <i>V. vermiformis</i> (gris par marquage du matériel génétique au DAPI et traitement informatique).....	154
Figure 44 : Observation d' <i>A. castellanii</i> (A), de <i>V. vermiformis</i> (B) et d'oocystes de <i>C. parvum</i> après 1 heure d'incubation dans un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en microscopie confocale. ..	155
Figure 45 : Observation d' <i>A. castellanii</i> (A), de <i>V. vermiformis</i> (B) et d'oocystes de <i>C. parvum</i> (C) après 3 heures d'incubation dans un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en microscopie confocale.	155
Figure 46: Observation d' <i>A. castellanii</i> et d'oocystes de <i>C. parvum</i> par video-microscopie.	157
Figure 47 : observation en microscopie confocale de Tnt1 entre deux trophozoites d' <i>A. castellanii</i> marqués en vert par Alexa Fluor™ 488 Phalloïdine et en rouge par la Tubulin-A594	158
Figure 48: Observation en microscopie confocale de Tnt2 entre deux trophozoites d' <i>A. castellanii</i> marqués en vert par Alexa Fluor™ 488 Phalloïdine et en rouge par la Tubulin-A594	158
Figure 49 : Evaluation de l'infectiosité des oocystes de <i>C. hominis</i> in vitro avec et sans acide taurocholique selon différentes conditions.	160
Figure 50: Dénombrement en microscopie optique d' <i>A. castellanii</i> avec ou sans oocystes de <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique.....	161
Figure 51 : Dénombrement en microscopie optique de <i>V. vermiformis</i> avec ou sans oocystes de <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique.....	162
Figure 52 : Dénombrement des kystes d' <i>A. castellanii</i> en co-incubation avec <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique	163
Figure 53 : Dénombrement des kystes de <i>V. vermiformis</i> en co-incubation avec <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique	163
Figure 54 : Dénombrement en microscopie optique des oocystes de <i>C. hominis</i> en co-incubation avec <i>A. castellanii</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique	164
Figure 55 : Dénombrement en microscopie optique des oocystes de <i>C. hominis</i> en co-incubation avec <i>V. vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique	165
Figure 56 : Evaluation de l'infectiosité des oocystes <i>C. hominis</i> en présence d' <i>A. castellanii</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique.....	166
Figure 57 : Evaluation de l'infectiosité des oocystes <i>C. hominis</i> en présence de <i>V. vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition planctonique	166
Figure 58 : Dénombrement d' <i>A. castellanii</i> en co-incubation avec des oocystes de <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique	167

Figure 59 : Dénombrement en microscopie optique de <i>V. vermiformis</i> avec et sans oocystes de <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm.....	168
Figure 60 : Dénombrement des kystes d' <i>A. castellanii</i> en co-incubation avec <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique	169
Figure 61 : Dénombrement des kystes de <i>V. vermiformis</i> en co-incubation avec <i>C. hominis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique	170
Figure 62 : Dénombrement des oocystes de <i>C. hominis</i> en co-incubation avec <i>A. castellanii</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique.	171
Figure 63 : Dénombrement des oocystes de <i>C. hominis</i> en co-incubation avec <i>V. vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique	172
Figure 64 : Evaluation de l'infectiosité des oocystes <i>C. hominis</i> en présence d' <i>A. castellanii</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR..	173
Figure 65 : Evaluation de l'infectiosité des oocystes <i>C. hominis</i> en présence de <i>V. vermiformis</i> selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR.....	173
Figure 66: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'abattement d' <i>A. castellanii</i> en présence d'oocystes de <i>C. parvum</i>	179
Figure 67: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'abattement de <i>V. vermiformis</i> en présence d'oocystes de <i>C. parvum</i>	180
Figure 68: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'abattement d' <i>A. castellanii</i> et de <i>V. vermiformis</i>	181
Figure 69: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'enkystement d' <i>A. castellanii</i> en présence ou non d'oocystes de <i>C. parvum</i>	182
Figure 70: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'enkystement de <i>V. vermiformis</i> en présence d'oocystes de <i>C. parvum</i>	183
Figure 71: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur le pourcentage de kystes d' <i>A. castellanii</i> et de <i>V. vermiformis</i>	184
Figure 72 : Effets de différents traitements sur l'abattement des oocystes de <i>C. parvum</i> en présence ou non d' <i>A. castellanii</i>	185
Figure 73: Effets de différents traitements sur l'abattement des oocystes de <i>C. parvum</i> en présence de <i>V. vermiformis</i>	186
Figure 74 : Effets de différents traitements sur l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> en présence d' <i>A. castellanii</i>	187
Figure 75 : Effets de différents traitements sur l'infectiosité des oocystes de <i>C. parvum</i> en présence de <i>V. vermiformis</i>	188

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du travail

ARB: Amoeba Resistant Bacteria

ARNm: Acide RiboNucléique messenger

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal

ATCC : American Type Culture Collection

ATU : Autorisation temporaire d'Utilisation

Caco-2 : Cellules tumorales humaines d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique

CC-qPCR : Culture cellulaire couplée à de la qPCR

CDC: Centers for Disease Control and prevention

CML : Corps MultiLamellaire

CNR-LE : Centre National de Référence – Laboratoire Expert

DAPI : Di-Aminido-Phenyl-Indol

DI50 : Dose de parasites provoquant l'infection de 50% des individus contaminés

DMEM: Dulbecco's modified eagles medium

DO: Densité optique

ECDC : European Centers for Disease Control and prevention

EDTA : acide Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique

EAG : Encéphalite amibienne granulomateuse

EPS : ExoPolySaccharide

ESCAPE : Epidemiosurveillance et Circulation des parasites dans les environnements

FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FISH: Hybridation In Situ end Fluorescence

FITC: Fluorescéine-5-IsoThioCyanate

FLA: Free Living Amoebae

GADPH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GEMS: Global Enteric Multicenter Study

GBD: Global Burden of Disease

HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy

HCl : Acide Chloridrique

HCT-8 : cellules d'adénocarcinome iléocal humain

HEPES : acide 4-(2-HydroxyEthyl) -1-Pipérazine Ethane Sulfonique

ID50 : Dose de parasites provoquant l'infection de 50% des individus contaminés

IMS : Immune-Séparation par des billes magnétiques

INRAE : Institut National de Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

IP : Iodure de Propidium

MEAP : Meningo Encéphalite Amibienne Primitive

MET : Microscopie Électronique à Transmission

MOI : Multiplicity of infection

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NOM : Natural Organic Matter

NTZ : NiTaZoxanide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Ow: oocysts wall

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

ppt : part per thousand (quantité en grammes de sels secs dissous dans un kg d'eau de mer)

PVC: PolyVinyl Chloride

PYG: Peptone Yeast extract Glucose medium

qPCR : PCR quantitative

QS : Quorum Sensing

RPMI: Rosewell Park Memorial Institute

RT-qPCR: Reverse transcriptase-qPCR

SCID : Deficit Immunitaire Combiné Sévère

SIDA : Syndrome d'Immuno-Deficience Acquise

SNC : Système Nerveux Central

Sp : sporozoïtes

SVF : Sérum de Veaux Fœtal

TIAC : Toxi Infections Alimentaires Collectives

Tnt : Tunneling nanotube

UE/EEE : Union Européenne/Espace Économique Européen

US-EPA: United States Environmental Protection Agency

UV : UltraViolet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction

Ce travail a été consacré à l'étude des interactions entre *Cryptosporidium* spp. et amibes libres (*Acanthamoeba castellanii* et *Vermamoeba vermiformis*) et a été réalisé au sein de l'EA 7510 ESCAPE (Epidémiologie et Circulation de Parasites dans les Environnements) (Universités de Rouen Normandie et de Reims Champagne-Ardenne).

A. castellanii et *V. vermiformis* sont deux espèces d'amibes libres retrouvées très fréquemment dans les réseaux d'eaux. Leur pathogénicité peut être directe et indirecte. Il a été montré que les amibes libres pouvaient phagocyter des micro-organismes pour se nourrir. Certains de ces microorganismes sont capables de résister à la phagocytose amibienne pouvant parfois y proliférer (i.e. *Legionella pneumophila*). Les amibes libres peuvent donc jouer un rôle dans la dissémination et la prolifération de microorganismes, pouvant alors favoriser certaines infections bactériennes. La phagocytose amibienne a également été décrite avec certains parasites et champignons tels que *Toxoplasma gondii* ou encore *Cryptococcus neoformans*. Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont émis dans les selles des individus infectés et persistent dans l'environnement, y compris hydrique. Ainsi *Cryptosporidium* spp. et amibes libres partagent le même environnement ; ils peuvent donc interagir entre eux, d'où l'étude des interactions entre ces deux parasites au cours de cette thèse.

L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les interactions entre les oocystes de *Cryptosporidium* (*parvum* et *hominis*) et certaines espèces d'amibes libres (*A. castellanii* et *V. vermiformis*). Il s'agissait donc : d'évaluer la survie des amibes libres en présence d'oocystes, d'évaluer l'éventuelle phagocytose amibienne des oocystes et d'évaluer la quantité et l'infectiosité des oocystes en co-incubation avec les amibes libres. Le dernier objectif a été d'évaluer la réponse à différents traitements de désinfection des amibes libres et de *C. parvum* afin d'évaluer la potentielle utilisation d'amibes libres pour modéliser la réponse aux traitements de *Cryptosporidium*.

Le présent manuscrit est ainsi composé d'une première partie dédiée à l'étude bibliographique de *Cryptosporidium* spp et des amibes libres où sont abordées leur taxonomie, morphologie, voies de transmission, pathogénicité, etc.... ainsi que la prévalence de ces microorganismes dans les environnements (notamment hydriques) et leur résistance aux traitements de désinfection.

Puis, les travaux expérimentaux sont présentés en trois parties. Les deux premières parties de ces travaux ont permis d'étudier les interactions entre les amibes libres et *Cryptosporidium* (*C. parvum* et *C. hominis*). Le choix des espèces de *Cryptosporidium* étudiées reposait sur le fait que *C. parvum* et *C. hominis* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées chez l'Homme (90% des cas). *C. parvum* est l'espèce la plus répandue en Europe, notamment parce que la transmission de la cryptosporidiose en Europe est principalement anthroponotique. En passant par le modèle animal, nous avons relativement facilement et régulièrement accès à des souches de *C. parvum* en quantité suffisante au projet d'étude. Il paraissait intéressant d'étudier *C. hominis*, car cette espèce essentiellement interhumaine est régulièrement responsable d'épidémies d'origine hydrique.

Au sein de la troisième partie, l'effet de différents traitements de désinfection a été évalué sur les microorganismes d'étude. En effet, les amibes libres et les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont connus pour résister aux procédures classiques de désinfection de l'eau comme la chloration. Devant les potentielles interactions entre ces microorganismes, la réponse à ce type de traitement sur ces microorganismes seuls et en association a été étudiée.

Revue de la littérature

1 *Cryptosporidium*

1.1 Historique

Le parasite du genre *Cryptosporidium* a été décrit pour la première fois par Tyzzer en 1907 via l'observation en microscopie optique de l'espèce *C. muris*, dans les glandes gastriques de souris de laboratoire (*Mus musculus*) (E. E. Tyzzer, 1907; Bones *et al.*, 2019). Tyzzer a décrit quelques années plus tard une deuxième espèce de *Cryptosporidium*, l'espèce *C. parvum*, également observée sur des souris de laboratoire mais infectant l'intestin grêle plutôt que l'estomac et dont les oocystes étaient plus petits que ceux de *C. muris* (4,5 x 4,0 µm pour *C. parvum* et 7,5 x 5,0 µm pour *C. muris*) (Dumoulin *et al.*, 2000a; Xiao *et al.*, 2004). Les premières publications de Tyzzer concernant la découverte de *Cryptosporidium* ont défini la plupart des connaissances actuelles sur la biologie et le cycle de vie (asexué et sexué) de *Cryptosporidium* (Tzipori and Widmer, 2008).

Cryptosporidium n'a été reconnu comme agent pathogène qu'en 1955 à la suite d'une épidémie de diarrhée dans un troupeau de dindes (Carey *et al.*, 2004). L'infection a ensuite principalement été observée chez les veaux et les moutons (Carey *et al.*, 2004) jusqu'en 1976, date à laquelle deux cas humains ont été déclarés pour la première fois, classant ainsi *Cryptosporidium* comme agent pathogène pour l'Homme (Fayer, 2004). En effet, en 1976, ce parasite a été isolé chez un enfant de 3 ans présentant une entérocolite aiguë sévère (Nime *et al.*, 1976) et chez un adulte immunodéprimé présentant un tableau de diarrhée sévère sans cause évidente (Meisel *et al.*, 1976). Dans les deux cas, une biopsie intestinale a été réalisée et des lésions de la muqueuse ont été observées ainsi que de petits microorganismes ronds de 2 à 4 µm sur la surface épithéliale de l'intestin prouvant la cryptosporidiose.

Le premier cas de cryptosporidiose chez un patient atteint du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience acquise) a été décrit en 1982 (Ma and Soave, 1983). Dans la même année, 50 autres cas ont été rapportés (Ma, 1984). En 1987, le parasite a été reconnu comme à l'origine d'une diarrhée d'origine hydrique chez les humains immunocompétents (Carey *et al.*, 2004). La cryptosporidiose a été reconnue comme problème de santé publique en 1993 après avoir été décrit comme l'étiologie de la plus grande épidémie d'origine hydrique dans le monde qui a eu lieu à Milwaukee aux États-Unis, épidémie qui sera décrite plus en détails page 48 (Fayer, 2004). À cette époque, l'infection à *Cryptosporidium*, faisait partie des critères définissant le SIDA d'après les CDC (Centers for Disease Control and prevention) en 1993 et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2007 (CDC, 1993) (OMS, 2007).

1.2 Taxonomie

Cryptosporidium spp. est un parasite protozoaire eucaryote unicellulaire. Selon la classification traditionnelle, *Cryptosporidium* spp. appartient au phylum des *Apicomplexa*. Des études récentes basées sur la génétique et la physiologie ont déplacé le genre *Cryptosporidium* de la sous classe des *Coccidia*, classe *Coccidiomorpha* à la nouvelle sous-classe, *Cryptogregarina* au sein de la classe des *Gregarinomorpha* du fait de nombreuses similitudes avec les grégarines (tableau I) (Armon *et al.*, 2016; Una Ryan *et al.*, 2016). Le genre *Cryptosporidium* est actuellement le seul membre des *Cryptogregarina* et est décrit comme un parasite épicytulaire (intracellulaire mais extracytoplasmique) de vertébrés possédant un organite nourricier de type grégarine mais dépourvu d'apicoplaste (Cavalier-Smith, 2014). Autres faits le différenciant des *Coccidia*, sa résistance aux traitements anticoccidiens et la possibilité d'auto-infestation (Barta and Thompson, 2006; García-Aljaro *et al.*, 2019).

Tableau I : Comparaison entre *Cryptosporidium* et grégarines (Una Ryan *et al.*, 2016)

Properties	<i>Cryptosporidium</i>	Gregarines	References
Life cycle	Monoxenous	Monoxenous	Levine, 1977; Fayer and Ungar, 1986; Rueckert <i>et al.</i> , 2013
Location within the host cell	Occurs in the intestines enterocyte brush border	Occurs in the intestines enterocyte brush border	Levine, 1984; Fayer, 2008;
Epicellular location	Yes	In some species (Gregarinoidea)	Valigurová <i>et al.</i> , 2007; Fayer, 2008
Feeder organelle	epimerite	mucron or epimerite	Huang <i>et al.</i> , 2004; Valigurová <i>et al.</i> , 2007; Borowski <i>et al.</i> , 2008; Wiser, 2011; Aldeyarbi and Karanis, 2016a;
Myzocytosis-like feeding (cytoplasm of the host is taken up by the attached parasite)	Yes	Yes	Valigurová <i>et al.</i> , 2007; Karanis and Aldeyarbi 2011; Aldeyarbi and Karanis, 2016a
Extracellular development	Yes	Yes	Hijawi <i>et al.</i> , 2002; Rosales <i>et al.</i> , 2005; Karanis <i>et al.</i> , 2008; Borowski <i>et al.</i> , 2010; Koh <i>et al.</i> , 2013, 2014; Huang <i>et al.</i> , 2014;
Ability for intracellular or extracellular asexual replication (merogony) of trophozoites	Yes	Yes	Lange and Lord, 2012; Aldeyarbi and Karanis, 2016a; Aldeyarbi and Karanis, 2016b
Undulating epicytic-like folds covering the surface of the extracellular stages	Yes	Described for some species belonging to Terragregarina.	Lucarotti 2000; Butaeva <i>et al.</i> , 2006; Valigurová <i>et al.</i> , 2007; Rueckert <i>et al.</i> , 2011; Desportes and Schrével 2013; Aldeyarbi and Karanis, 2016a
Presence of parasitiphorous sac/ vacuole	Double-membrane	Multi-membranous for <i>Ditrypanocystis</i> species	Butaeva <i>et al.</i> , 2006; Valigurová <i>et al.</i> , 2015
Presence of Apicoplast	Absent	Mostly absent	Zhu <i>et al.</i> , 2000; Abrahamsen <i>et al.</i> , 2004; Cavalier-Smith, 2014
Syzygy (end to end pairing for reproduction)	Present	Present	Beams <i>et al.</i> , 1959; Vavra and McLaughlin, 1970; Hijawi <i>et al.</i> , 2002; Kuvardina and Simdyanov, 2002; Toso and Omoto 2007; Borowski <i>et al.</i> , 2010; Rueckert <i>et al.</i> , 2011; Desportes and Schrével 2013; Aldeyarbi and Karanis, 2016a; Aldeyarbi and Karanis, 2016c
Ability of sporozoites/zoites to develop directly into sexual stages without merogony	Reported for <i>C. parvum</i>	Urosporoidea (formerly eugregarines)	Rueckert <i>et al.</i> , 2013; Aldeyarbi and Karanis, 2016c
Auto-infective oocysts	Yes	Reported in <i>Triboliocystis garnhami</i> and <i>Farinocystis tribolii</i>	Dissanaike 1955, Žižka 1972; Fayer, 2008
No. of sporozoites/oocyst	Four	Four in many species	Kuriyama <i>et al.</i> , 2005; Fayer, 2008, Wiser, 2011
Presence of the apical complex organelles as conoid and polar rings in sporozoites	Yes	Reported in <i>Mattesia grandis</i>	Vavra and McLaughlin, 1970; Aldeyarbi and Karanis, 2016b

1.3 Espèces

Il y a actuellement 42 espèces reconnues de *Cryptosporidium* (Zahedi and Ryan, 2020) dont 20 espèces ont été identifiées chez l'Homme (Tableau II). Parmi ces espèces, *C. parvum* et *C. hominis* sont responsables de 90% des cas humains (Daraei *et al.*, 2021). Parmi les autres espèces isolées chez l'Homme, principalement les immunodéprimés, on peut citer *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. muris* et *C. viatorum* (tableau II) (Feng *et al.*, 2018; Innes *et al.*, 2020). Des cas d'infections multiples ont été décrits initialement chez des patients atteints du SIDA (Cama *et al.*, 2006).

Tableau II : Principales espèces de *Cryptosporidium* retrouvées chez les humains et chez les mammifères domestiques (Feng *et al.*, 2018)

Host	Tier 1 species ^a	Tier 2 species ^b	Tier 3 species ^c
Humans	<i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. canis</i> , <i>C. ubiquitum</i> , <i>C. cuniculus</i> , <i>C. viatorum</i> , chipmunk genotype I, <i>C. muris</i>	<i>C. andersoni</i> , <i>C. suis</i> , <i>C. bovis</i> , horse genotype, <i>C. xiaoi</i> , skunk genotype, mink genotype, <i>C. erinacei</i> , <i>C. fayeri</i> , <i>C. scrofarum</i> , <i>C. tyzzeri</i>
Cattle	<i>C. parvum</i> , <i>C. bovis</i>	<i>C. ryanae</i> , <i>C. andersoni</i>	<i>C. occultus</i> , <i>C. ubiquitum</i> , <i>C. xiaoi</i>
Sheep & goats	<i>C. xiaoi</i> , <i>C. ubiquitum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. andersoni</i>
Pig	<i>C. suis</i> , <i>C. scrofarum</i>	<i>C. muris</i>	–
Camels	<i>C. andersoni</i> , <i>C. muris</i>	<i>C. parvum</i>	–
Horses and donkeys	Horse genotype, <i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i>	<i>C. andersoni</i>	<i>C. muris</i> , <i>C. tyzzeri</i> , <i>C. felis</i> (?), <i>C. proliferans</i>
Dogs	<i>C. canis</i>	<i>C. parvum</i> , <i>C. muris</i>	<i>C. scrofarum</i> , <i>C. ubiquitum</i> , <i>C. hominis</i>
Cat	<i>C. felis</i>	<i>C. muris</i>	<i>C. parvum</i> , <i>C. ryanae</i> , rat genotype III
Rabbit	<i>C. cuniculus</i>	–	–
House mouse	<i>C. tyzzeri</i> , <i>C. muris</i>	<i>C. parvum</i>	–

^aTier 1 species: *Cryptosporidium* spp. that are responsible for over 90% of infections in the specified host.

^bTier 2 species: *Cryptosporidium* spp. that have been each reported in at least five cases.

^cTier 3 species: *Cryptosporidium* spp. for which confirmed detection has been each reported in fewer than five individuals.

Avant 2002, les publications ne mentionnaient, chez l'Homme, que *C. parvum*. Cependant, grâce à l'évolution des données biologiques et moléculaires, il a été démontré que bon nombre des infections rapportées initialement à *C. parvum* étaient en fait dues à une espèce différente mais structurellement indiscernable appelée *C. hominis* (Morgan-Ryan *et al.*, 2002). Il a d'ailleurs été montré que ces deux espèces étaient très similaires au niveau de leur génome. En effet, en comparant les génomes de ces deux espèces, il a été montré une divergence de séquences de l'ordre de 3 à 5% sans qu'aucune insertion, délétion ou réarrangement important ne soit évident. Ce qui veut dire que 96 à 97% des séquences sont identiques soit 4000 gènes parmi 8 chromosomes (Xu *et al.*, 2004).

La distribution géographique des espèces de *Cryptosporidium* varie dans le monde. *C. hominis* est plus prévalent en Amérique, en Australie et en Afrique tandis que *C. parvum* est retrouvé préférentiellement au Moyen Orient et en Europe (Cacciò, 2005; Xiao, 2010). C'est donc dans les pays en développement que *C. hominis* est l'espèce la plus répandue surtout chez les enfants (78% pour *C. hominis* et 10% pour *C. parvum*) (tableau III) (Mmbaga and Houpt, 2017). La transmission de *C. parvum* chez l'Homme est principalement anthroponotique dans les pays en développement alors qu'elle est plutôt zoonotique dans les pays développés. La transmission de *C. hominis* est anthroponotique peu importe la zone géographique (Xiao, 2010).

Tableau III : répartition des cas de cryptosporidiose infantile entre les espèces *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium parvum* chez les enfants dans les pays en développement (Mmbaga and Houpt, 2017)

Reference, Year	Country	<i>C Hominis</i> %	<i>C Parvum</i> %
Sow et al, ³⁹ 2016	Multisite	78	10
Tellevik et al, ¹³ 2015	Tanzania	85	8
Gatei et al, ³⁷ 2006	Kenya	87	9
Gatei et al, ⁴⁰ 2003	Multisite	75	22
Tumwine et al, ¹⁴ 2005	Uganda	73	18
Sarkar et al, ⁴¹ 2013	India	79	16
Eibach et al, ⁸ 2015	Ghana	58	42
Xiao et al, ³⁶ 2001	Peru	79	9

Il est intéressant de souligner, que dans certaines zones endémiques comme la Thaïlande, l'Inde ou encore le Pérou, le taux d'infection par *C. meleagridis* est aussi élevé que celui de *C. parvum* et serait lié à un contact avec des oiseaux (dindes, poulet..) principaux réservoir de cette espèce (Robinson and Chalmers, 2020). Dans le reste du monde, la contamination par cette espèce, est liée à des voyages dans des pays endémiques (Elwin *et al.*, 2012; Kopacz *et al.*, 2019).

1.1 Cycle

Cryptosporidium est un parasite intracellulaire qui infecte l'épithélium gastro-intestinal de nombreux vertébrés (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020). Son cycle est monoxène et composé d'une partie asexuée et d'une partie sexuée (figure 1). La contamination se fait par ingestion d'oocystes, chaque oocyste contenant quatre sporozoïtes (Bones *et al.*, 2019). Après ingestion, les oocystes vont se dékyster sous l'action de la trypsine et des sels biliaries. Les sels biliaries, favorisent le dékystement mais ne sont pas indispensables ce qui expliquerait l'infection de sites extra-intestinaux (Certad, 2008). Ce dékystement permet la libération des sporozoïtes infectieux qui se déplacent jusqu'à la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin.

Les sporozoïtes se transforment ensuite en trophozoïtes à l'intérieur de vacuoles parasitophores formées dans la région microvillositaire de l'épithélium muqueux (Certad, 2008). S'ensuit la mérogonie (multiplication asexuée des trophozoïtes à l'intérieur des cellules hôtes pour former des mérozoïtes puis des mérontes de type I et II), la gamétogonie (formation de micro et macro-gamètes à partir de mérontes de type II), la fécondation des micro et macro-gamètes donnant des zygotes qui évolueront en oocystes. Enfin la sporogonie est à l'origine de la formation des sporozoïtes infectieux à l'intérieur des oocystes. Il y aurait formation de 2 types d'oocystes : des oocystes à paroi fine (20%) qui seraient impliqués dans des cycles d'auto-infestation et des oocystes à paroi épaisse (80%) qui seraient émis dans le milieu extérieur lors de la défécation (Bouzid *et al.*, 2013a; Guérin and Striepen, 2020).

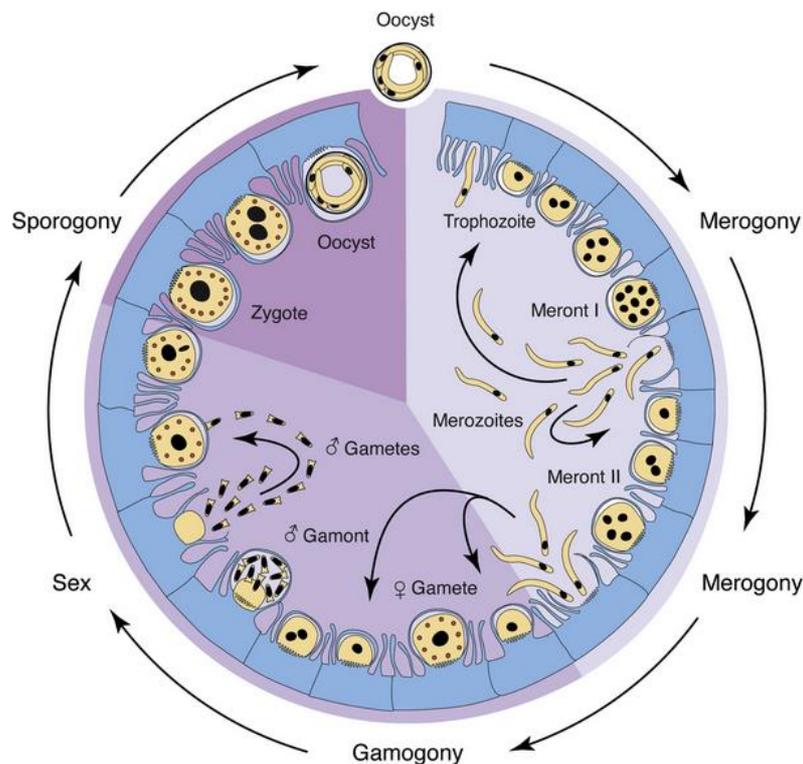


Figure 1 : Cycle de vie de *Cryptosporidium* (Guérin and Striepen, 2020).

1.2 Transmission

La transmission du parasite se fait de manière fécale-orale par ingestion d'oocystes infectieux. Elle peut être directe - anthroponotique (transmission de personne à personne) ou - anthro-po-zoonotique (transmission d'animal à humain) ou encore - zoonotique (d'animal à animal). Chez l'Homme, la contamination directe est fréquente dans les pays en développement (Rossle and Latif, 2013). La transmission peut également se faire de manière indirecte par ingestion d'eau contaminée (potable ou récréative) ou d'aliments contaminés (légumes, produits laitiers, cidres...). Ce mode de contamination est lié à une contamination environnementale (eau, sols) par des selles animales ou humaines contenant des oocystes infectieux. Cette transmission indirecte est la plus fréquente dans les pays développés (Ryan *et al.*, 2018).

Quelques études ont rapporté une transmission par inhalation de gouttelettes ou par contact avec des objets précédemment contaminés par projection de gouttelettes via la toux (U. Ryan *et al.*, 2016; Sponseller *et al.*, 2014). Différentes études ont retrouvé la présence de *Cryptosporidium* dans les voies respiratoires d'enfants immunodéprimés souffrant de cryptosporidiose intestinale. Cependant, *Cryptosporidium* a été retrouvé dans les voies respiratoires de patients sans atteintes intestinales (absence de symptômes gastro-intestinaux, ni d'excrétion d'oocystes dans les selles) indiquant la possibilité d'une infection respiratoire primaire acquise par inhalation de gouttelettes (Sponseller *et al.*, 2014).

En France, les principaux facteurs de risques rapportés chez les individus infectés étaient les suivants : contact avec un animal (23% des cas), contact direct avec un patient infecté (25% des cas), consommation d'eau non embouteillée (60% des cas) et consommation d'aliments potentiellement contaminés dans 23% des cas. Des proportions similaires pour l'eau, le contact avec les animaux et l'Homme contaminé, ont été retrouvées aux États-Unis (Gharpure, 2019), au Canada (Innes *et al.*, 2020; Majowicz *et al.*, 2001) et en Europe (Cacciò and Chalmers, 2016; Costa *et al.*, 2020; Kotloff *et al.*, 2013).

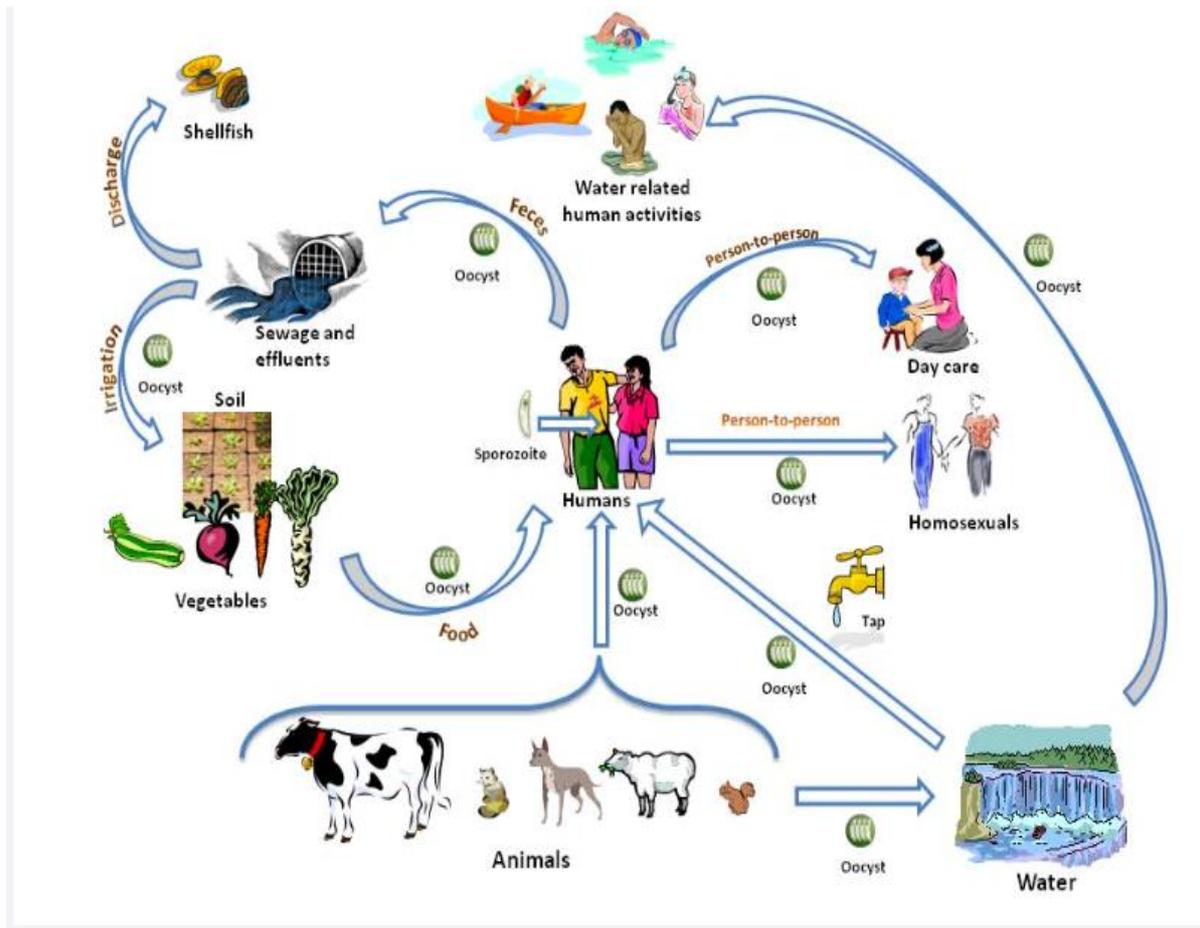


Figure 2: Cycle environnementale de *C. parvum* (Armon and Cheruti, 2011)

Cryptosporidium est un parasite infectant le tractus intestinal d'environ 152 espèces (Armon *et al.*, 2016). Les animaux sont donc considérés comme un réservoir important de *Cryptosporidium* (Rossle and Latif, 2013). *C. parvum* est l'espèce la plus répandue, pouvant infecter la majorité des mammifères tandis que *C. hominis* a initialement été décrit comme spécifique à l'Homme. Cependant, *C. hominis* est de plus en plus retrouvé chez d'autres hôtes comme les bovins ou encore les chevaux (Figure 3) (Zahedi and Ryan, 2020).

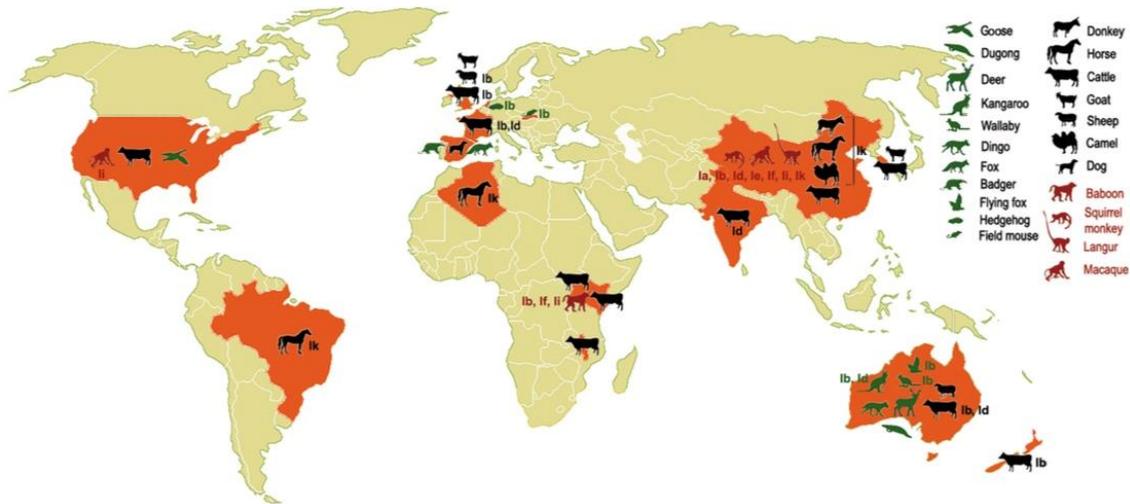


Figure 3: Distribution mondiale des infections à *Cryptosporidium hominis* chez les animaux (Widmer *et al.*, 2020)

Concernant les animaux de rente, *C. parvum* est l'espèce la plus répandue (Rossle and Latif, 2013). Les bovins infectés excrètent des millions d'oocystes dans l'environnement, (Saini *et al.*, 2000). Il a été estimé une quantité d'oocystes émis dans le fumier de bétail de l'ordre de $3,2 \times 10^{23}$ oocystes/an (Vermeulen *et al.*, 2017). Un veau infecté par 10^5 oocystes excrétera entre 10^9 et 10^{10} oocystes sur une période de 7 à 10 jours (Fayer, 2004).

Il en résulte un risque de contamination environnementale élevé. En effet, les eaux de ruissellement provenant de terres agricoles (traitées par exemple avec du fumier), peuvent contaminer les eaux de surface locales et les puits qui fournissent de l'eau pour la consommation humaine (Daraei *et al.*, 2021; Innes *et al.*, 2020; Lamb, 2018). L'irrigation des cultures avec de l'eau contaminée ou encore l'application de fumier comme engrais sont des facteurs de risques de contamination des végétaux et donc de l'Homme (Ryan *et al.*, 2018).

Le bétail constitue donc un réservoir important de transmission zoonotique par contamination directe et/ou indirecte de l'eau et des aliments. Il a été démontré en Angleterre qu'après une épidémie de fièvre aphteuse, l'accès du publique aux zones rurales a été réduit ayant eu pour conséquence une diminution de 40% des cas de cryptosporidiose humaine (Sopwith *et al.*, 2005). Des épidémies chez les individus en contact avec les veaux (étudiants en médecine vétérinaire; chercheurs en science animales) sont régulièrement décrites (Goh *et al.*, 2004; Preiser *et al.*, 2003; Rossle and Latif, 2013).

Les animaux domestiques sont également impliqués en pathologie humaine. *C. canis* et *C. felis* ont été décrits comme la cause de diarrhées chez des enfants dans des bidonvilles au Pérou (Chalmers, 2012).

Les Rongeurs peuvent également être à l'origine d'une contamination humaine surtout en milieu urbain, comme en atteste la description de cas de *C. muris* chez l'Homme (Ramirez *et al.*, 2004). Selon une étude, *C. parvum* a d'ailleurs été retrouvé chez 60% des rongeurs sauvages (Dumoulin *et al.*, 2000).

Certains oiseaux migrateurs ont un rôle dans la dissémination des oocystes, il a été démontré que certaines espèces d'oie et de canard pouvaient excréter les oocystes dans leurs fèces pendant au moins une semaine. D'autres espèces comme les cafards, les scarabées, les mouches et les rotifères jouent un rôle dans le portage des oocystes et donc dans la propagation environnementale de ce parasite (Ronald Fayer *et al.*, 2000). Pour exemple, des oocystes de *C. parvum* ont été retrouvés dans le tractus intestinal de cafards collectés dans la maison d'un enfant ayant la cryptosporidiose ce qui suggère que même les cafards pourraient jouer un rôle dans la dissémination du parasite (Ronald Fayer *et al.*, 2000).

1.3 Morphologie

Les Oocystes

Les oocystes ont une forme ovoïde et un diamètre qui varie entre 4 et 8 μm . Leur paroi comporte une couche interne et une couche externe qui leur confèrent une grande résistance. La paroi des oocystes est chargée négativement en surface. Ceci permettrait au parasite de former des grappes avec d'autres oocystes constituant ainsi une seconde forme de protection. Les oocystes au centre de la grappe seraient ainsi moins exposés aux facteurs physico-chimiques de l'environnement (Balthazard-Accou *et al.*, 2017). L'oocyste présente également une ligne de suture longitudinale à l'une de ses extrémités (Rose *et al.*, 1989) qui permet la libération des sporozoïtes lors du dékystement (Certad, 2008; Robertson *et al.*, 1993). À l'intérieur des oocystes, quatre sporozoïtes sont retrouvés (figure 4).

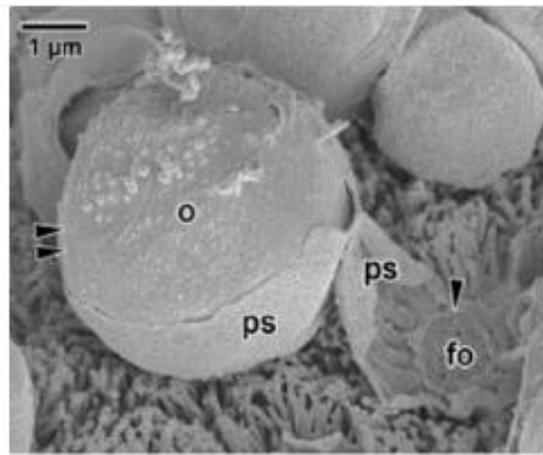


Figure 4: Morphologie d'un oocyste de *Cryptosporidium* en microscopie électronique à balayage (o: oocyste, ps: vacuole parasitophore, fo: organelle nourricier) (Certad, 2008).

Les Sporozoïtes

Les sporozoïtes (0,8 x 2 μm) sont les formes infectieuses (Bones *et al.*, 2019). Ils sont mobiles et en forme de virgules. Ils possèdent un complexe apical qui leur permet de se fixer à la cellule hôte. Une fois fixées, les microvillosités entourent les sporozoïtes et forment une vacuole parasitophore avec la formation d'un organelle d'attachement dit nourricier (Leitch and He, 2011)(figure 5).

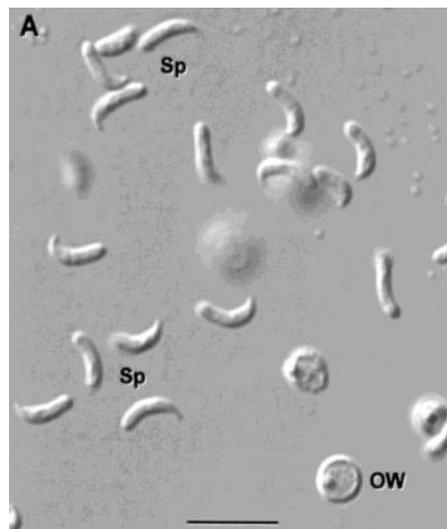


Figure 5 : Sporozoïtes de *Cryptosporidium parvum* observés en microscopie à contraste interférentiel différentiel (Sp : sporozoïtes, OW : oocysts walls)(Petry, 2004)

1.4 Pouvoir pathogène

1.4.1 Doses infectantes

Chez l'immunocompétent naïf vis à vis de *Cryptosporidium*, la dose nécessaire pour infecter 50% des sujets (DI 50) est estimée entre 10 et 83 oocystes pour *C. hominis* (Chappell *et al.*, 2006) et 132 pour *C. parvum* (DuPont *et al.*, 1995). Cependant, cette dose ainsi que la clinique associée varient considérablement selon les isolats de *Cryptosporidium* mais aussi selon l'état immunitaire du patient (tableau IV)(Chalmers and Davies, 2010; Ryan *et al.*, 2018; Una Ryan *et al.*, 2016). La dose infectieuse minimale pour *C. hominis* a été déterminée à 10 oocystes mais en réalité un seul oocyste suffirait à provoquer une infection chez l'homme immunodéprimé (Una Ryan *et al.*, 2016).

Il a été montré qu'une primo-infection ne suffisait pas à protéger ultérieurement de l'infection par *C. parvum* (Chalmers and Davies, 2010; Chappell *et al.*, 2006). Pour les patients ayant des anticorps préexistants dirigés contre *Cryptosporidium* (ayant déjà contracté une cryptosporidiose), la dose infectante est environ 20 fois plus élevée (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020b; Chalmers and Davies, 2010; Chappell *et al.*, 1999).

Tableau IV : Infection à *Cryptosporidium* et caractéristiques cliniques chez des volontaires infectés expérimentalement sans preuve d'anticorps anti-*cryptosporidium* préexistants (Chalmers and Davies, 2010)

	Study reference					
	DuPont et al. (1995)	Okhuysen et al. (1999)	Okhuysen et al. (1999)	Okhuysen et al. (1999)	Okhuysen et al. (2002)	Chappell et al. (2006)
Study isolate and source	<i>C. parvum</i> IOWA Calf isolate, propagated in calves in Arizona	<i>C. parvum</i> IOWA Calf isolate, propagated in calves in Arizona	<i>C. parvum</i> TAMU Foal isolate, propagated via a human in calves in Arizona	<i>C. parvum</i> UCP Calf isolate, propagated in calves in Portland	<i>C. parvum</i> Moredun Deer isolate propagated in sheep in Scotland then calves in Arizona	<i>C. hominis</i> TU502 Human isolate, propagated in piglets
Infectious dose ID50 (clinical ^a ; microbiological ^b)	132 (clinical definition with microbiological confirmation)	87; 74.5	9; 125	1042; 2788	300; 375	10; 83
Clinical attack rate (proportion of subjects developing symptoms)	≥1000 oocysts: 100% ≥300 oocysts: 88% 30 oocysts: 20%	52%	86%	59%	69%	62% 500 oocysts: 75% 100 oocysts: 71% 30 oocysts: 60% 10 oocysts: 40% No
Asymptomatic shedding of oocysts	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Prepatent period (microbiological) mean (days)	≥1000 oocysts: 6 300–500 oocysts: 9 30–100 oocysts: 10	7.7	4	7	5 (4–9)	
Incubation period (clinical) mean; median (days)	9; 6.5	9; 7	5; 5	11; 6	Median only 3	5.4; 4
Patent period (duration of shedding) (days)	≥1000 oocysts: 12 300–500 oocysts: 10 30–100 oocysts: 2	8.4	3.4	3.3	5 (1–11)	
Duration of diarrhoea (h)	74	64.2 (6–223)	94.5 (6–195)	81.6 (6–193)	Median 169 (6–360)	1373 (49–518)
Severity (mean number of unformed stools)	12.7	7	9	8	19	
Relapse rate (%)		18	58	46		

^a Clinical = symptoms reported.

^b Microbiological = oocysts detected in stools.

1.4.2 Facteurs de virulence

Cryptosporidium perturbe les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin. Ces altérations peuvent être le résultat du processus inflammatoire (Bouزيد *et al.*, 2013; Okhuysen *et al.*, 1998). En effet, la fixation d'un sporozoïte à la surface apicale des cellules épithéliales déclenche une cascade de voies de signalisation secondaires au sein de la cellule hôte. L'activation du système du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) entraîne la libération de cytokines et de chimiokines qui induisent une inflammation et la survie anti-apoptotique des cellules directement infectées, tandis que l'activation du système c-src provoque un dysfonctionnement et l'apoptose des cellules saines (McCole *et al.*, 2000). Il en résulte une atrophie des villosités entraînant une malabsorption intestinale (Chappell *et al.*, 2006).

Certains facteurs de virulence, ont été identifiés comme des gènes impliqués dans le dékystement, la motilité, l'adhérence, l'invasion, la formation de vacuoles parasitophores, le maintien intracellulaire et les dommages aux cellules hôtes (Bouزيد *et al.*, 2013; Fayer *et al.*, 2009; Wanyiri and Ward, 2006) (Figure 6).

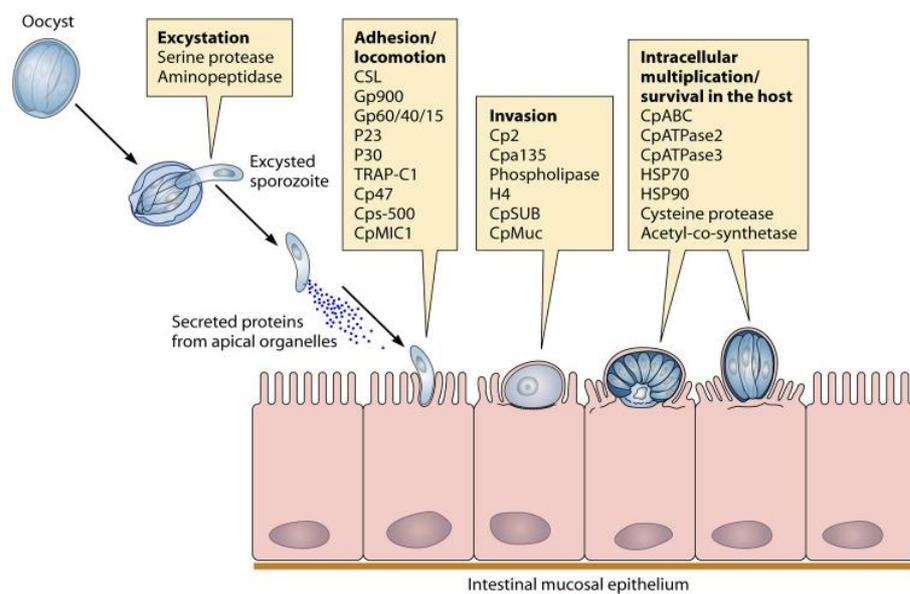


Figure 6: Facteurs de virulence de *Cryptosporidium* décrits et leur contribution au cycle de vie du parasite (Bouزيد *et al.*, 2013)

1.4.3 Clinique

1.4.3.1 Immunocompétents

La période d'incubation entre l'ingestion des oocystes et les premiers symptômes est comprise entre 3 et 14 jours et est influencée par le nombre d'oocystes ingérés ou encore la réponse immunitaire de l'hôte (Chappell *et al.*, 1999). Les oocystes sont détectables dans les selles, 1 à 3 jours avant l'apparition des symptômes (Chalmers and Davies, 2010). Selon une étude française sur des données obtenues à partir de 750 rapports en ligne de participants volontaires (hôpitaux et laboratoires) dans la surveillance de la cryptosporidiose entre 2017 et 2019 puis analysés par le CNR-LE (Centre National de Référence – Laboratoire Expert cryptosporidiose), 77% des patients infectés par *Cryptosporidium* présentaient des symptômes. La diarrhée hydrique était le principal symptôme, elle a été retrouvée chez 98% des patients. Les autres symptômes retrouvés étaient de la fièvre (22%), des nausées (21%), une perte de poids (27%), une déshydratation (15%), des douleurs abdominales (44%), des vomissements (25%) ou encore une asthénie et des myalgies (Costa *et al.*, 2020). Les symptômes cessent, de manière spontanée, en moyenne après 1 à 3 semaines mais les oocystes restent émis dans les selles jusqu'à 90 jours après l'infection (Afssa, 2002).

Plusieurs études ont été menées sur le suivi à long terme des symptômes ressentis par les patients dans des contextes post épidémiques. Au Royaume-Uni, une étude cas-témoin a révélé que les cas infectés par *C. hominis* étaient plus à risque de souffrir de douleurs articulaires, oculaires, de maux de tête et de fatigue dans les deux mois suivant l'infection que les témoins (Hunter *et al.*, 2004).

Il a également été suggéré que l'infection pouvait provoquer des rechutes dans la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Manthey *et al.*, 1997). Un lien entre *C. parvum* et syndrome du côlon irritable a également été décrit. En effet, lors d'une étude expérimentale sur des rats, *C. parvum* a déclenché des changements pathologiques à long terme similaires à ceux observés chez les patients atteints du syndrome du côlon irritable (Khaldi *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2006).

1.4.3.2 Immunodéprimés

Chez les immunodéprimés, l'infection provoque une diarrhée qui peut être chronique et qui est d'autant plus sévère que l'immunodépression est forte. Le pronostic vital peut être mis en jeu lié à une déshydratation sévère consécutive à la diarrhée (Guyot *et al.*, 2012). Des troubles extra-intestinaux ont été rapportés chez les patients immunodéprimés. En effet chez ces personnes, des cryptosporidioses biliaires et pancréatiques ainsi que des infections respiratoires ont été décrites (Chalmers and Davies, 2010).

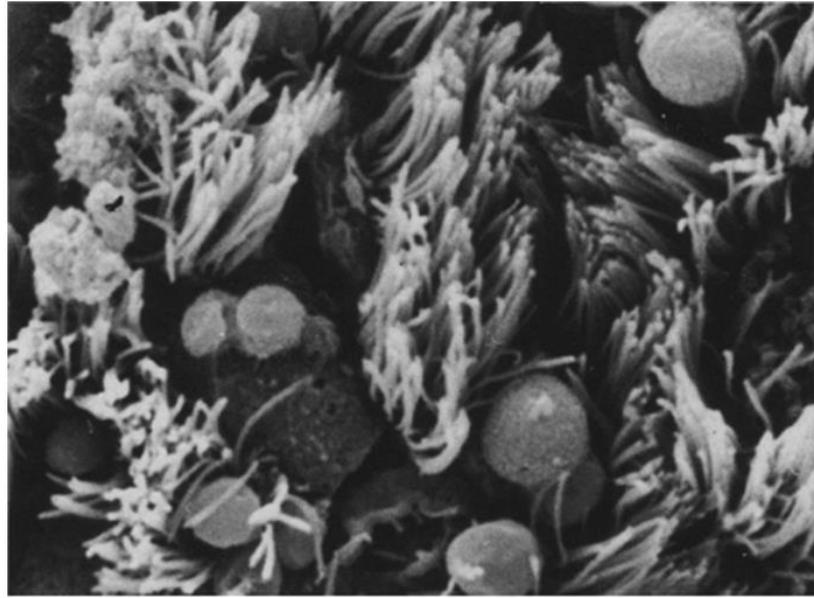


Figure 7: Microscopie électronique à balayage de *Cryptosporidium* dans la muqueuse bronchique humaine (Sponseller et al., 2014).

Il a été démontré que les patients ayant les formes les plus graves étaient les patients présentant un déficit immunitaire en cellules T. Parmi eux, sont retrouvés, les patients atteints d'hémopathies malignes, de déficits primaires en cellules T (SCID (Déficit immunitaire combiné sévère)), de déficit en ligands CD40 (syndrome hyper IgM)) ainsi que les patients dont le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 100 cellules/mm³ (Chalmers and Davies, 2010; Navin *et al.*, 1999). Plus précisément, un taux de CD4⁺ < 200 cellules/mm³ entrainerait un risque de cryptosporidiose chronique alors qu'un taux < 100 cellules/mm³ entrainerait un risque de cryptosporidiose sévère pouvant mettre en jeu le pronostic vital (Leitch and He, 2012).

En France, 50% des cas ont été retrouvés chez des patients ayant bénéficié d'une transplantation d'organes solides (majoritairement rénale), 25% des cas chez des patients atteints du VIH et 25% des cas chez des patients atteints d'une maladie auto-immune ou de déficits immunitaires. Dans cette population, le taux mortalité était de l'ordre de 5% (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020b; Costa *et al.*, 2020).

Plusieurs études épidémiologiques et expérimentales (*in vivo* et *in vitro*) ont permis de renforcer l'hypothèse d'une association entre *Cryptosporidium* et cancer. En effet, plusieurs études cliniques ont signifié qu'il y avait un lien entre la cryptosporidiose et la néoplasie digestive humaine dans différentes populations renforçant l'idée d'une relation causale. Au Liban, une étude clinique a suggéré un lien entre la cryptosporidiose et le cancer colorectal en identifiant une infection à *Cryptosporidium* par PCR dans 21% des biopsies de patients avec une néoplasie du colon récemment diagnostiquée contre 7% des biopsies de patients sans néoplasie digestive mais présentant des symptômes gastro-intestinaux persistants. Le risque d'infection à *Cryptosporidium* était 4 fois plus élevé dans le premier groupe (Osman *et al.*, 2017). Une étude cas témoins chinoise a décrit un taux d'infection à *Cryptosporidium* de 17.24% chez des patients atteints d'un cancer colorectal avant chimiothérapie. Cette étude a également rapporté la présence du parasite dans les cancers du foie, de l'œsophage et de l'intestin grêle (Sawant *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

1.4.3.3 Enfants

Chez les enfants, la cryptosporidiose peut entraîner une malnutrition, un retard de croissance persistant, une réponse immunitaire altérée, des déficits cognitifs et des décès surtout chez les enfants de moins de 5 ans et vivant dans des pays en développement (U. Ryan *et al.*, 2016). Les enfants sont très sensibles à la cryptosporidiose, en effet en Europe le taux de cryptosporidiose chez les enfants de 0 à 4 ans est élevé par rapport aux autres groupes d'âges comme le montre la figure 9. Cette sensibilité accrue serait due à l'immaturation de leur système immunitaire (Euzéby, 2002).

Des études réalisées en Afrique, Amérique centrale, du sud et en Asie du sud-est ont montré que la cryptosporidiose était un acteur prédictif de mortalité infantile (Widmer and Sullivan, 2012).

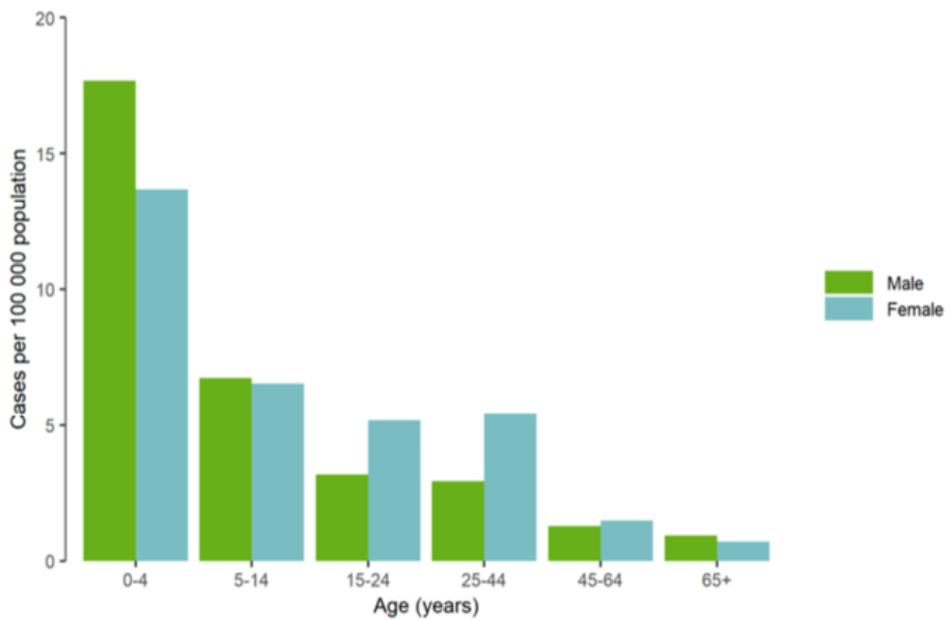


Figure 8: Répartition des cas confirmés de cryptosporidiose pour 100 000 habitants, par âge et par sexe, en UE/EEE (Union Européenne/Espace Économique Européen) 2018 (Belgique, Bulgarie, Croatie, Chypre, République Tchèque, Estonie, Finlande, Allemagne, Grèce, Hongrie, Islande, Irlande, Lettonie, Lituanie, Luxembourg, Malte, Pays-Bas, Norvège, Pologne, Portugal, Roumanie, Slovaquie, Slovénie, Espagne, suisse et Royaume-Uni (ECDC, 2019).

1.4.4 Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risques décrits dans la cryptosporidiose sont les suivants : le contact avec un animal contaminé et en particulier avec un animal de rente. Le contact avec un individu infecté (enfants de moins de 2 ans par exemple à l'occasion des changements de couches). Les baignades en eau douce et en piscines (contaminées par des individus malades). La consommation d'eau du robinet, la consommation de végétaux contaminés consommés crus (salade, épinards, radis...) ou peu cuits. L'augmentation des précipitations (saisons des pluies) pouvant ainsi faciliter la contamination des sols par lessivage. Le surpeuplement (vie en collectivité (crèches)), la défécation à l'air libre et l'absence de toilettes (conditions hygiènes précaires), l'allaitement, les voyages en zones à bas niveau d'hygiène et les déficits immunitaires (hémopathies, transplantation...)(Armon *et al.*, 2016; Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020; Bouzid *et al.*, 2013b).

1.5 Diagnostic

Le diagnostic repose sur l'analyse des selles émises par les patients soit par microscopie, soit par détection antigénique, soit par biologie moléculaire (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020). Aujourd'hui la technique de référence repose encore sur l'analyse microscopique. La coloration de référence est la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (oocystes colorés en rouge par la carbo-fuschine alors que les selles sont colorées en vert/bleu avec le vert de malachite) (fig. 9B) ; bien que les PCR se développent de plus en plus (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020).

La cryptosporidiose est une maladie sous-diagnostiquée: une étude réalisée en Angleterre a démontré que pour un cas diagnostiqué il y en avait environ 8,2 cas qui ne l'étaient pas (Innes *et al.*, 2020; Tam *et al.*, 2012). Ce sous-diagnostic est lié à la maladie qui est spontanément résolutive chez les immunocompétents, pouvant entraîner l'absence de consultation médicale. Il a été estimé que parmi les patients atteints de cryptosporidiose, 1 patient sur 10 consultera un médecin généraliste et que la recherche de *Cryptosporidium* spp. sera réalisée dans 1 cas sur 100 (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020; Cacciò and Chalmers, 2016).

Le parasite du genre *Cryptosporidium* est méconnu par les médecins généralistes comme agent étiologique de diarrhée d'autant plus que la symptomatologie est très peu spécifique et ne permet pas de la distinguer d'une autre pathologie gastro-intestinale d'origine infectieuse. C'est pourquoi la détection microbiologique de *Cryptosporidium* spp. dans les selles est une analyse très peu prescrite (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020; Innes *et al.*, 2020). De plus, dans la grande majorité des laboratoires, la recherche de cryptosporidies n'est réalisée que sur cette prescription spécifique, expliquant en partie ce sous diagnostic.

Enfin, la cryptosporidiose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France comme dans de nombreux pays et n'est donc pas systématiquement surveillée par les services de santé publique. Il en résulte également des difficultés à remonter sur une origine parasitaire lors de TIAC (Toxi-Infections Alimentaires Collectives) car les aliments ne sont pas conservés suffisamment longtemps pour prouver l'origine parasitaire et le temps d'incubation est relativement long (Costa *et al.*, 2020).

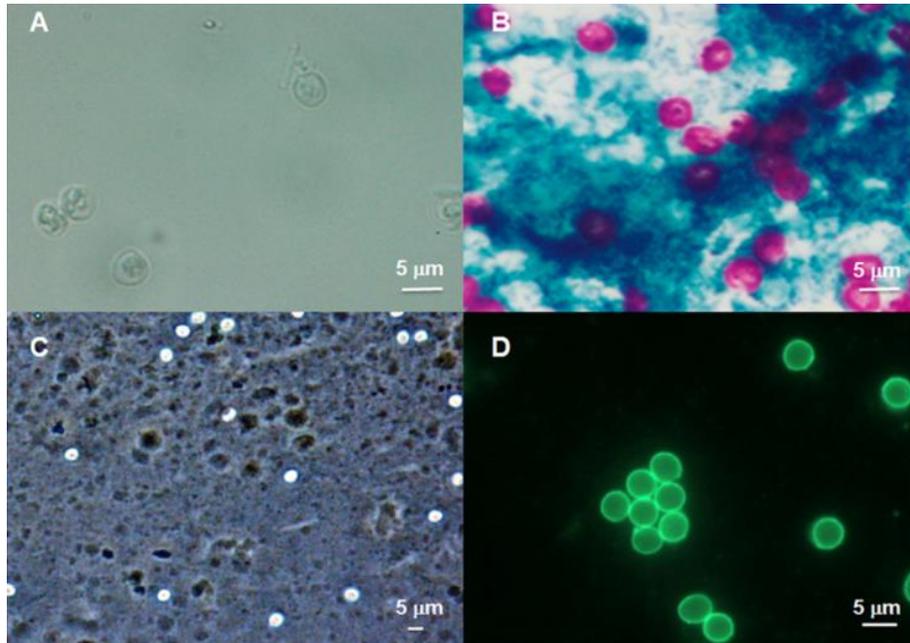


Figure 9: Oocystes de *Cryptosporidium* observés en microscopie. (A) après séparation immunomagnétique. (B) après Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée. (C) après Coloration de Heine. (D) après marquage spécifique par un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020).

1.6 Détection dans l'eau et les matrices alimentaires

Les méthodes standardisées pour la détection et le dénombrement des oocystes dans les échantillons d'eau et d'environnement sont décrites dans les normes ISO 15553 :2006 et NF T90-455. Elles sont similaires à celles décrites par la méthode USEP A 1623, 1623.1 de 2005 et 2012 de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis et de l'agence pour l'environnement du Royaume-Uni. Ces méthodes sont toutes basées sur les étapes suivantes : filtration d'eau (10 à 1000 L), élution du filtre et concentration par centrifugation, séparation et concentration immunomagnétique (IMS), coloration avec un anticorps immunofluorescent pour détection et dénombrement des oocystes par microscopie à fluorescence. Ces méthodes ne permettent pas de déterminer la viabilité ni l'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium* (Anses, 2019).

Il existe également depuis 2016 une méthode ISO standard (ISO 18744 :2016) pour la détection des oocystes dans certains aliments (légumes verts feuilles et fruits à baies). Les grands principes de détection sont les mêmes que pour la détection en eau. Cependant, les taux de récupération des oocystes sont faibles (34%) et dépendent des matrices investiguées (Kubina *et al.*, 2021; Razakandrainibe *et al.*, 2020).

1.7 Évaluation de la viabilité et de l'infectiosité des oocystes

Les méthodes normatives de détection de *Cryptosporidium* spp. dans l'eau et les matrices alimentaires ne permettent pas de préjuger de la viabilité ou de l'infectiosité des oocystes. Les oocystes peuvent être non viables, c'est à dire incapables de libérer les sporozoïtes qu'ils contiennent ou bien les sporozoïtes libérés peuvent être incapables de pénétrer dans les entérocytes intestinaux et avoir perdu leur caractère infectieux (Afssa, 2002).

La viabilité peut être évaluée par dékystement *in vitro*, par des marqueurs de viabilités ou encore par la RT-qPCR. Ces méthodes ne peuvent cependant pas prédire l'infectiosité des sporozoïtes (Rousseau *et al.*, 2018).

Le dékystement

Les oocystes sont mis en présence d'acide taurocholique ce qui va favoriser leur dékystement, c'est à dire la libération de sporozoïtes. Si les oocystes sont capables de dékyster, ils sont considérés comme viables (Canada, 2005).

La méthode d'inclusion/exclusion

Cette méthode est basée sur l'inclusion ou l'exclusion de deux marqueurs de viabilité, le DAPI et l'iodure de propidium (IP). Les oocystes peuvent être viables (inclusion du DAPI et exclusion de l'IP) ou non viables (inclusion du DAPI et de l'IP) (Iturriaga *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 1998).

RT-qPCR

Cette méthode est basée sur la détection de d'ARNm dans les cellules. L'ARNm détecté par RT-qPCR montre ainsi que les cellules sont métaboliquement fonctionnelles et actives et donc considérées comme viables (Rousseau *et al.*, 2018).

Évaluation de l'infectiosité

In vivo

Pour évaluer l'infectiosité des oocystes, la méthode de référence reste le modèle animal (Delaunay *et al.*, 2000). Cette méthode consiste à inoculer des oocystes à un animal sensible (souris, gerbilles...) puis à détecter la présence d'oocystes dans l'intestin ou les fèces. Cette méthode reste coûteuse, modérément efficace, n'est pas assez sensible pour la surveillance environnementale et pose de réels problèmes d'éthique vis à vis de l'expérimentation animale (Canada, 2005; Delaunay *et al.*, 2000; Korich *et al.*, 2000; Kubina, 2021; Okhuysen *et al.*, 2002; Rochelle *et al.*, 2002).

In vitro

Une autre méthode, *in vitro*, plus rapide et moins coûteuse que le modèle animal a été développée au laboratoire. Cette méthode consiste à inoculer des oocystes non dékystés sur des monocouches cellulaires. En effet, Kubina *et al.*, a publié en 2021 une étude montrant que le dékystement des oocystes de *C. parvum* au préalable n'était pas nécessaire pour infecter les cellules (Kubina *et al.*, 2021).

Les cellules utilisées sont les cellules d'adénocarcinome iléo-caecal humain (HCT-8) ou les cellules tumorales humaines d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique CaCo-2. Après une incubation de 24 à 72h, les monocouches de cellules sont examinées par immunofluorescence directe (Slifko *et al.*, 1997) ou par PCR (Di Giovanni *et al.*, 1999; Rochelle *et al.*, 1997) pour vérifier la présence de *Cryptosporidium* en phase de reproduction. Cette méthode a été employée pour estimer l'infectiosité des oocystes dans l'eau (Di Giovanni *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2001; Rochelle *et al.*, 2002) et elle a donnée des résultats semblables à ceux du modèle animal (Hijjawi *et al.*, 2001; Rochelle *et al.*, 2002; Slifko *et al.*, 2002).

Le laboratoire a développé la CC-qPCR associant la culture cellulaire et la PCR. Cette méthode permet d'obtenir un deltaCq qui correspond à la différence de Cq entre les puits infectés sans cellules et les puits infectés avec cellules. Plus le deltaCq sera élevé plus les oocystes seront viables et infectieux (Kubina *et al.*, 2021).

1.8 Traitements

1.8.1 Symptomatique et curatif

D'après l'analyse récente des cas déclarés en France, la moitié des patients atteints de cryptosporidiose n'a reçu aucun traitement (271/542) et pour les autres, le traitement était essentiellement symptomatique (tableau V) (Costa *et al.*, 2020).

Tableau V : Thérapies utilisées dans le traitement de la cryptosporidiose en France entre 2017 et 2019 (Costa *et al.*, 2020)

Therapy Used	Number of Cases	Proportion (%)
Oral rehydration	64	24
Parenteral hydration	67	25
Nitazoxanide	101	37
Anti diarrheal	147	54
Antiemetic	19	7
Antibiotic	43	16
Immunosuppressive therapy tapering	33	12
Others *	19	7

* unspecified.

Un traitement symptomatique peut être efficace afin de réduire l'intensité des symptômes. Des traitements comme des antispasmodique, des anti-diarrhéiques ou encore une réhydratation dans les cas les plus graves sont utilisés.

Le Nitazoxanide (NTZ) est le seul traitement de la cryptosporidiose chez les immunocompétents qui a été approuvé par la Food and Drug administration américaine en 2002 (Ashigbie *et al.*, 2021). Ce médicament reste couteux et en France, il nécessite une Autorisation temporaire d'utilisation (ATU) (Divoux *et al.*, 2016). Plusieurs études ont montré que le NTZ améliorait significativement la réponse clinique et réduisait la durée de la diarrhée et l'excrétion d'oocystes chez les adultes et les enfants immunocompétents (Ashigbie *et al.*, 2021; Rossignol *et al.*, 2006, 2001). Cependant, il reste inefficace chez les immunodéprimés et chez les enfants malnutris (Ashigbie *et al.*, 2021; Zahedi and Ryan, 2020).

Des essais cliniques randomisés réalisés chez des adultes et des enfants de plus de 12 ans ont comparé un traitement par NTZ 500mg 2x/J à un placebo pendant 3 jours. Les résultats ont montré des taux de guérison clinique (> 87%) et parasitologique (> 90%) significativement plus élevés chez les patients ayant reçu le NTZ que chez les patients ayant reçu le placebo (41% pour la clinique et 37% pour la recherche parasitologique) (Rossignol *et al.*, 2006).

Le NTZ n'est pas plus efficace qu'un placebo chez les immunodéprimés et les enfants malnutris. En effet, selon une étude réalisée sur 50 enfants malnutris séropositifs pour le VIH et 50 enfants séronégatifs, le NTZ (100mg 2x/J pdt 3 jours) n'a guéri cliniquement que 56% des enfants séronégatifs contre 23% recevant le placebo. Chez les séropositifs, le taux de guérison clinique était de 8% avec le NTZ et 25% avec le placebo. Il est tout de même intéressant de noter une diminution de la mortalité chez les enfants séronégatifs ayant reçu du NTZ par rapport aux enfants ayant reçu un placebo (0 vs 18% respectivement) après 8 jours de traitements. Chez les séropositifs au VIH le taux de mortalité reste identique que ce soit avec le NTZ ou avec le placebo (Amadi *et al.*, 2002).

Chez les patients atteints du VIH, la restauration de la fonction immunitaire par le biais d'antirétroviraux (Highly active antiretroviral therapy – HAART) reste le meilleur traitement contre la cryptosporidiose (Cacciò and Pozio, 2006). La HAART a été introduite dans les années 90 entraînant une diminution de la prévalence et de la mortalité chez les patients séropositifs dans les pays développés même si cette pathologie demeure encore une complication sérieuse du SIDA dans les pays en développement dont l'accès à ces traitements est limité (Zardi *et al.*, 2005).

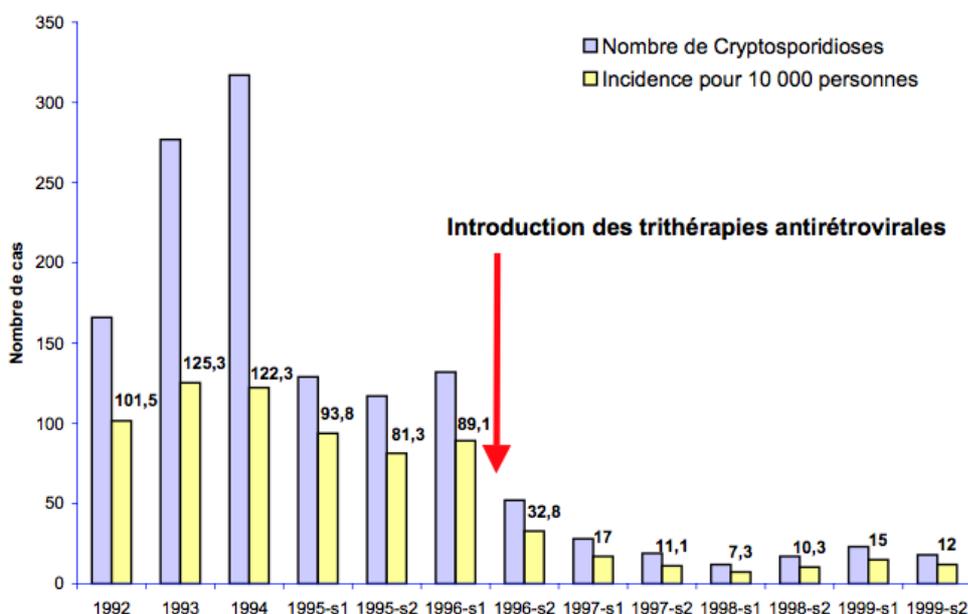


Figure 10 : Évolution de l'incidence de la cryptosporidiose, chez les patients infectés par le VIH par années ou semestres (données CISIH-Décembre 2000) (Afssa, 2002).

L'absence de traitement et de vaccination spécifique chez les humains et les animaux ainsi que les implications socio-économiques ont conduit l'OMS à inclure la cryptosporidiose dans la liste des maladies négligées en 2004 (Benamrouz-Vanneste *et al.*, 2020b).

1.8.2 Prophylaxie

Au vu du peu d'options thérapeutiques disponibles et l'absence de vaccin efficace, la prévention individuelle et collective est le principal moyen de contrôle de la cryptosporidiose afin de réduire l'exposition au parasite (Chalmers and Davies, 2010).

Prévention individuelle

Le lavage des mains est un élément clef dans la prévention de la cryptosporidiose mais aussi dans la prévention de nombreuses infections microbiennes. L'hygiène des mains avec de l'eau et du savon doit se faire après l'utilisation ou le nettoyage des toilettes, le changement de couches, les soins apportés à une personne souffrant de diarrhée, l'élimination des excréments et le lavage de matériaux souillés tels que les vêtements ou la literie. Elle doit se faire également avant de manger ou de préparer des aliments et après tout contact avec des animaux de fermes et domestiques (Chalmers and Davies, 2010).

Les fruits et les légumes doivent être également lavés de manière rigoureuse dans les zones les plus à risques, l'eau doit être consommée embouteillée, filtrée ou bouillie surtout pour les personnes immunodéprimés (Bonnin *et al.*, 2012).

Prévention collective

Les résidus des activités agricoles doivent être traités de manière adéquate pour assurer la protection des animaux, du public susceptible d'être exposé à ces déchets et de l'environnement. Il faut éviter les fortes densités d'animaux dans les exploitations et isoler les animaux diarrhéiques, il faut réaliser un nettoyage et une désinfection des locaux et du matériel selon les recommandations. Il faut également un bon renouvellement de l'air et un bon respect du stockage des déchets et des cadavres d'animaux. Dans certains pays où la contamination est surtout anthroponotique, il faut éviter les latrines ainsi que l'utilisation d'engrais humains (Innes *et al.*, 2020; Paoletti, 2002).

1.9 Prévalence de *Cryptosporidium* spp.

1.9.1 Chez l'Homme

Actuellement, la cryptosporidiose a été rapportée dans 95 pays du monde (Ryan *et al.*, 2014). La prévalence mondiale de l'infection à *Cryptosporidium* a été estimée à 7,6% d'après des données obtenues dans 69 pays (Dong *et al.*, 2020).

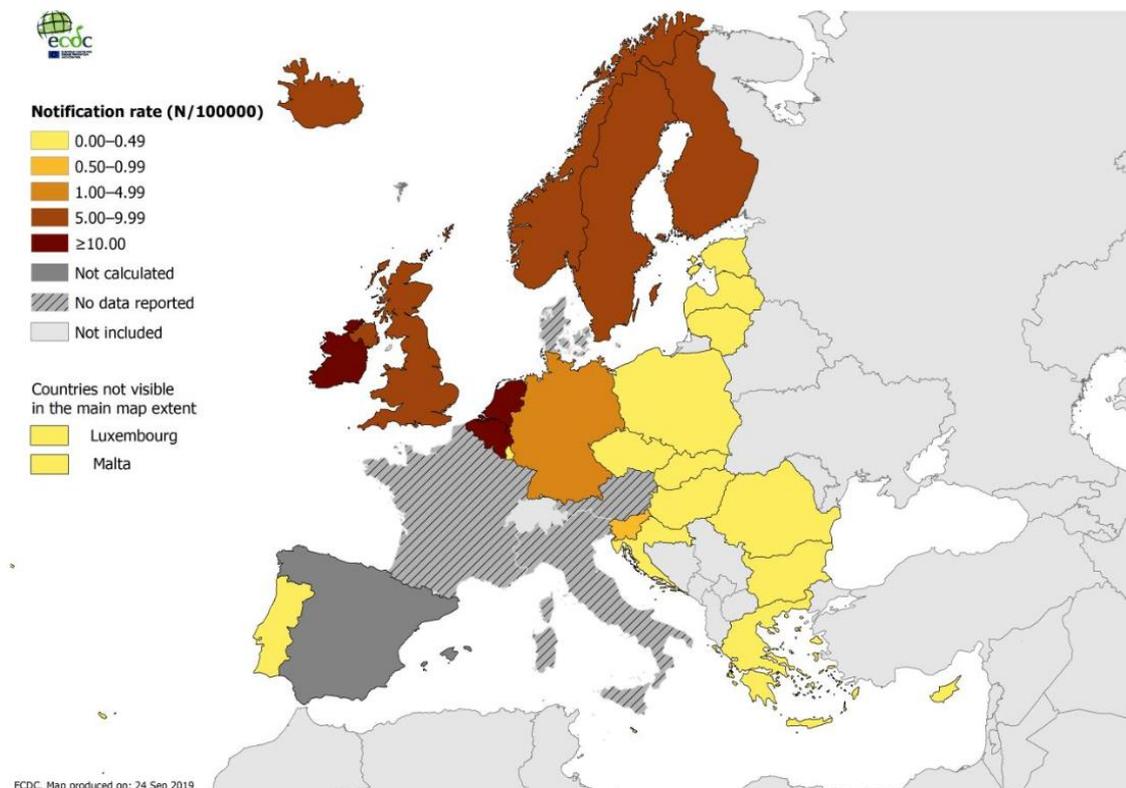
La prévalence varie considérablement selon les pays. En effet, selon une enquête sur les selles de patients souffrant de gastro-entérites, la prévalence rapportée de *Cryptosporidium* était de 1 à 4% en Europe et en Amérique du Nord est de 1 à 37 % en Afrique, en Asie, en Australie et en Amérique du sud et centrale (Rossle and Latif, 2013).

La prévalence de la cryptosporidiose est différente selon les pays et les tranches d'âges. Dans les pays en développement, la population la plus touchée par *Cryptosporidium* est celle comprenant les nourrissons de moins d'un an. Dans les pays industrialisés, deux types de population sont les plus touchées, les enfants entre 2 et 4 ans et les adultes en âge d'élever des enfants mais de manière moins importante que la première population (Cacciò and Chalmers, 2016; Chalmers, 2012; GBD, 2015, 2018; Kotloff *et al.*, 2013).

Chez les immunocompétents, dans les pays développés, la prévalence de la cryptosporidiose est de l'ordre de 1% (Current and Garcia, 1991; Ehsan *et al.*, 2017; Geurden *et al.*, 2009; Guerrant, 1997). Dans les pays en développement, la prévalence est plus élevée et varierait entre 10 et 30% (Current and Garcia, 1991; Ehsan *et al.*, 2017; Haque *et al.*, 2003).

Chez les immunodéprimés, en Afrique, Asie et Amérique latine, l'infection à *Cryptosporidium* touche entre 5 et 50% des patients au stade SIDA (Ashigbie *et al.*, 2021; Nakibirango *et al.*, 2019; Opoku *et al.*, 2018; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2019; Sannella *et al.*, 2019; Swathirajan *et al.*, 2017). Une revue systématique de la littérature comprenant plus de 100 publications a estimé la prévalence globale de la cryptosporidiose à 14% chez les patients au stade SIDA (Ashigbie *et al.*, 2021; Centers for Disease Control (CDC), 1987). Dans les pays industrialisés, la cryptosporidiose des patients immunodéprimés est désormais majoritaire chez les transplantés d'organes solides avec une prévalence estimée à 30% environ. (Ashigbie *et al.*, 2021; Florescu and Sandkovsky, 2016).

En 2018, le rapport de l'ECDC a rapporté plus de 14 000 cas de cryptosporidiose confirmés dans l'Union Européenne. La majorité des cas (76%) ont été déclarés en Allemagne, aux Pays-Bas, en Espagne et au Royaume-Uni. Le Royaume-Uni représentait à lui seul 41% des cas déclarés. En Europe, par rapport au nombre d'habitants, le nombre de cas déclaré était de 4,4 pour 100 000 habitants cependant des taux beaucoup plus élevés ont été retrouvés aux Pays-Bas (20/ 100 000 habitants) et en Irlande (12/ 100 000 habitants) (figure 11) (ECDC, 2019).



Source: Country reports from Belgium, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czechia, Estonia, Finland, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom.

Figure 11: distribution des cas confirmés de cryptosporidiose pour 100 000 habitants par pays en Europe en 2018) (ECDC, 2019).

Dans les pays développés *Cryptosporidium* représente environ 9 % des épisodes diarrhéiques chez les enfants (U. Ryan *et al.*, 2016). Le taux de portage chez les enfants immunocompétents en France, Espagne, Royaume-Uni et États-Unis se situe entre 1,3% et 3,8% (Cordell and Addiss, 1994; Davies and Chalmers, 2009; Lamb, 2018). Dans les pays en développement tels que, le Brésil, le Venezuela, l'Indonésie, la Thaïlande, l'Afrique du sud, le Ghana, l'Inde et le Bangladesh, la prévalence de la cryptosporidiose infantile varie de 3 à 13 %. (Vanathy *et al.*, 2017).

En population pédiatrique, plusieurs grandes études prospectives ont permis de mettre en évidence la gravité de la cryptosporidiose :

La **Global Enteric Multicenter Study (GEMS)**, s'est déroulée entre 2007 et 2011. des enfants atteints de diarrhée modérée à sévère (10 000 enfants) âgés de 0 à 59 mois ont été comparé à un bras témoin de 13 000 enfants en Afrique (Gambie, Kenya, Mali et Mozambique) et en Asie (Bangladesh, Inde et Pakistan) (Kotloff *et al.*, 2013). Cette étude a montré que la majorité des enfants atteints de diarrhée avaient entre 0 et 24 mois et que la cryptosporidiose était la deuxième cause de diarrhée après le *Rotavirus* pour les moins de 1 an et la 3ème cause de diarrhée pour les enfants âgés de 1 à 2 ans. Dans ces régions, les estimations de l'étude GEMS prévoient, entre 3 et 5 millions de cas et 200 000 décès attribuables à la cryptosporidiose par an chez les moins de 2 ans (Ryan *et al.*, 2018; U. Ryan *et al.*, 2016; Sow *et al.*, 2016).

L'étude, **Eiology, risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the consequences for Child-Health and Development Project, MAL-ED** s'est déroulée entre 2009 et 2014 et a porté sur plus de 2000 enfants âgés de 1 à 24 mois dans des sites urbains et ruraux en Afrique (Afrique du Sud, Tanzanie), en Asie (Bangladesh, Inde, Népal, Pakistan) et en Amérique du Sud (Brésil, Pérou). Sur ces sites, *Cryptosporidium* était l'un des 4 agents pathogènes les plus souvent liés à la diarrhée au cours de la première année de vie (avec le *Campylobacter*, *Norovirus* et *Rotavirus*) (Ashigbie *et al.*, 2021; Platts-Mills *et al.*, 2015).

L'étude, **Global Burden of Diseases, injuries, and Risk Factors Study (GBD)** a analysé en 2016 le fardeau de la diarrhée dans 195 pays et a rapporté que *Cryptosporidium* était la quatrième cause de mortalité par diarrhée chez les enfants de moins de 5 ans avec 48 301 décès annuel (GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators, 2018; Khalil *et al.*, 2018; Sawant *et al.*, 2020)

1.9.2 Chez les animaux

La cryptosporidiose est également une pathologie vétérinaire bien connue en particulier chez les bovins. La prévalence de la cryptosporidiose chez les veaux, varie de 1% (Kváč *et al.*, 2006) à 59% (Olson *et al.*, 1997; Santín *et al.*, 2008) , il a même été décrit des prévalences de 100% dans le cas d'exploitations contaminées (Santín *et al.*, 2004). En France, selon différentes études portant sur plusieurs régions, la prévalence de *Cryptosporidium* chez les veaux était comprise entre 17,9% et 43,4% (Lefay *et al.*, 2000).

La variation de la prévalence chez les bovins est dépendante de l'âge des animaux. En effet, la prévalence décroît avec l'âge (de Graaf *et al.*, 1999; Santín *et al.*, 2008), elle est maximale chez les veaux non sevrés (45,8%) et décroît chez les veaux sevrés (18,5%) et chez les génisses (2,2%) (Santín *et al.*, 2008). Chez les moutons la prévalence varie de 10 à 68 % (Connelly *et al.*, 2013; Majewska *et al.*, 2000; Rossle and Latif, 2013), elle est de 11 à 35,2 % chez les chèvres (Noordeen *et al.*, 2000; Rossle and Latif, 2013; Watanabe *et al.*, 2005) de 1 à 10% chez les porcs (Canada, 2005; Olson *et al.*, 1997) et de 18,9% chez les ongulés (Hatam-Nahavandi *et al.*, 2019).

Chez le chien, la prévalence varie entre 0 et 11% et estimée à 10% en France (Bourdais-Massenet and École nationale vétérinaire d'Alfort, 2008). Il existe une spécificité d'espèce relative pour *Cryptosporidium*. Chez les mammifères des espèces sont plus adaptées à l'hôte mais l'espèce *C. parvum* reste la plus répandue dans le monde animal et peut être à l'origine d'infections aussi bien animales qu'humaines.

1.9.3 Prévalence dans l'environnement

Dans l'eau

Selon une méta-analyse de 2020, la prévalence globale de *Cryptosporidium* dans tous les types d'eau dans le monde entre 1983 et 2019, était de 36% dont 25,7% ont été retrouvés dans les eaux traitées et 40,1% dans les eaux non traitées (eaux de surface, eaux brutes, eaux usées, eaux souterraines, eaux marines) (Daraei *et al.*, 2020).

La prévalence dans les eaux varie selon les pays mais varie également selon les types d'eaux. Il a été rapporté une prévalence de *Cryptosporidium* spp selon les types d'eau répartie de la manière suivante : eaux usées (46,9%) > eaux de surface (45,3%) > eaux brutes (31,6%) > eau potable (25,5%) > eaux de réservoirs (24,5%) > eaux souterraines (18,8%) > eaux de piscine (7,5%) > eaux de mer (0,2%) (Daraei *et al.*, 2020).

Dans les aliments

Il a été rapporté une contamination de nombreuses matrices alimentaires à *Cryptosporidium* sp. Parmi eux, on peut citer de forte prévalence pour la laitue (24,2%) et surtout les radis (53%) probablement dû au fait que toutes les parties de ses aliments sont comestibles et que le radis est en contact direct avec la terre. La prévalence dans les herbes aromatiques varie de 28,6% pour le basilic à 6,8% pour le persil. Pour les mollusques, des oocystes viables de *Cryptosporidium* ont été retrouvés dans 34,4 et 53% des échantillons de mollusques et de crustacés cultivés (tableau VI) (Gómez-Couso *et al.*, 2003).

Tableau VI : Prévalence de *Cryptosporidium* dans les aliments (Kubina, 2021)

ALIMENT	PRÉVALENCE MOYENNE (%) [min-max]	PAYS (NOMBRE D'ÉCHANTILLONS ANALYSÉS)
Légumes		
Laitue	24,2 [0-78]	Costa-Rica (80) ¹ , Norvège (125) ² , Ghana (72) ³ (168) ⁶ , République tchèque (129) ⁴ , Espagne (13) ⁵ , Canada (446) ⁷ , Égypte (73) ⁸ (80) ¹² , Éthiopie (23) ⁹ , Iran (80) ¹⁰ , Vietnam (9) ¹¹ , Nigéria (25) ¹³ , Chine (98) ¹⁴
Épinard	10,4 [0-40]	Canada (59) ¹⁵ (387) ⁷ , Nigéria (25) ¹³ , Chine (60) ¹⁴
Cresson	23,0 [9-44]	Iran (90) ¹⁶ , Égypte (116) ¹² , Vietnam (9) ¹¹
Chou	13,3 [0-75]	Espagne (6) ⁵ , Chine (62) ¹⁴ , Corée (3) ¹⁸ (70) ¹⁹ , Ghana (168) ⁶ , Inde (47) ²⁰ , Canada (44) ⁷ , Éthiopie (96) ⁹ , Égypte (10) ¹² , Nigéria (25) ¹³
Poivron	9,9 [3-22]	Éthiopie (66) ⁹ , Ghana (168) ⁶ , Égypte (30) ¹²
Poireau	10,4 [3-22]	Iran (90) ¹⁶ , Irak (80) ²¹ , Égypte (100) ¹²
Oignon	8,7 [0-19]	Iran (54) ¹⁶ , Égypte (94) ⁸ (100) ¹² , Chine (16) ¹⁴ , Irak (80) ²¹ , Ghana (72) ³
Carotte	14,4 [0-78]	Égypte (20) ¹² , Corée (3) ¹⁸ , Nigéria (25) ¹³ , Éthiopie (62) ⁹ , Inde (25) ²⁰ , Bangladesh ²² , Ghana (72) ³ , République tchèque (138) ⁴
Tomate	21,9 [1-75]	Corée (73) ¹⁹ , Inde (56) ²⁰ , Ghana (72) ³ , Éthiopie (100) ⁹ , Égypte (87) ⁸ (12) ¹² , Nigéria (25) ¹³ , Bangladesh ²²
Céleri	13,7 [0-33]	Vietnam (9) ¹¹ , Irak (80) ²¹ , Chine (17) ¹⁴
Concombre	26,5 [2-75]	Inde (52) ²⁰ , Égypte (93) ⁸ , Bangladesh ²² , République tchèque (129) ⁴
Radis	53,0 [6-100]	Inde (14) ²⁰ , Canada ²¹
Salade (4 ^{ème} gamme)	3,4 [1-6]	Canada ²⁵ , Italie (72) ²⁴
Herbes aromatiques		
Coriandre	20,5 [4-40]	Iran (90) ¹⁶ , Costa-Rica (80) ¹ , Inde (28) ²⁰ , Vietnam (9) ¹¹
Persil	6,8 [0-21]	Norvège (7) ² , Égypte (65) ⁸ (88) ¹² , Irak (80) ²¹
Basilic	28,6 [1-56]	Iran (90) ¹⁶ , Vietnam (9) ¹¹
Menthe	15,8 [9-23]	Iran (82) ¹⁶ , Bangladesh ²²
Fruits		
Fraise	2 [0-5]	Norvège (62) ² , République tchèque (156) ²³
Myrtille	20,1 [7-33]	Corée (3) ¹⁸ (44) ¹⁹
Framboise	0	Norvège (10) ²
Mollusques bivalves		
Moules	40,6 [12-80]	Brésil (179) ²⁷ , États-Unis (159) ²⁸ (15) ³⁰ , Italie (60) ³¹ , Canada ³² , Norvège (56) ³³ , Hollande (14) ³⁴
Huître	35,0 [6-89]	Brésil (120) ²⁶ , États-Unis (265) ²⁹ , Hollande (46) ³⁵

¹Monge & Arias, 1996 ; ²Robertson & Gjerde, 2001 ; ³Kudah et al., 2018 ; ⁴Huvarova et al., 2018 ; ⁵Amorós et al., 2010 ; ⁶Duedu et al., 2014 ; ⁷Lalonde & Gajadhar, 2016 ; ⁸Ahmad et al., 2016 ; ⁹Alemu et al., 2019 ; ¹⁰Avazpoor et al., 2015 ; ¹¹Chau et al., 2014 ; ¹²El-Sherbini et al., 2016 ; ¹³Maikai et al., 2013 ; ¹⁴Li et al., 2020 ; ¹⁵Bohaychuck et al., 2009 ; ¹⁶Ranjbar-Bahadori et al., 2013 ; ¹⁷Robertson et al., 2001 ; ¹⁸Hong et al., 2014 ; ¹⁹Sim et al., 2017 ; ²⁰Utaaker et al., 2017a ; ²¹Sleman Ali et al., 2018 ; ²²Rahman et al., 2014 ; ²³Dziedzinska et al., 2018 ; ²⁴Caradonna et al., 2017 ; ²⁵Dixon et al., 2013 ; ²⁶Guiguet Leal et al., 2008 ; ²⁷Santos et al., 2018 ; ²⁸Tei et al., 2016 ; ²⁹Graczyk et al., 2007 ; ³⁰Staggs et al., 2015 ; ³¹Marangi et al., 2015 ; ³²Lévesque et al., 2010 ; ³³Srisuphanunt et al., 2009 ; ³⁴Robertson & Gjerde, 2008 ; ³⁵Schets et al., 2007.

Entre 2009 et 2017, plus de 600 épidémies liées à *Cryptosporidium* ont été décrites aux États-Unis, en Angleterre et aux Pays de Galles (Ashigbie *et al.*, 2021; Chalmers *et al.*, 2019; Gharpure, 2019). Plus précisément, aux États-Unis, 444 épidémies ont été décrites représentant 7645 cas, 287 hospitalisations et 1 décès (Dong *et al.*, 2020; Gharpure, 2019). Une origine hydrique a été retrouvée dans 41,2% des épidémies soit 67,2% des cas ce qui en fait le principal mode de transmission. La contamination par l'alimentation ne comprenant pas l'eau de boisson représentait quant à elle que 5% des épidémies (Gharpure, 2019).

De plus, aux États-Unis, le nombre d'épidémies de cryptosporidiose signalées est en constante augmentation avec une croissance de plus de 10% par an au cours de la dernière décennie (Ashigbie *et al.*, 2021; Gharpure, 2019a). Cette augmentation a également été décrite dans le monde, en effet, *Cryptosporidium* a été à l'origine de 239 épidémies d'origine hydrique (Europe, Australie et Amérique du Nord) entre 2011 et 2016 contre 120 entre 2004 et 2010 (Baldursson and Karanis, 2011; Efstratiou *et al.*, 2017; Sawant *et al.*, 2020b).

Impacts socio-économiques

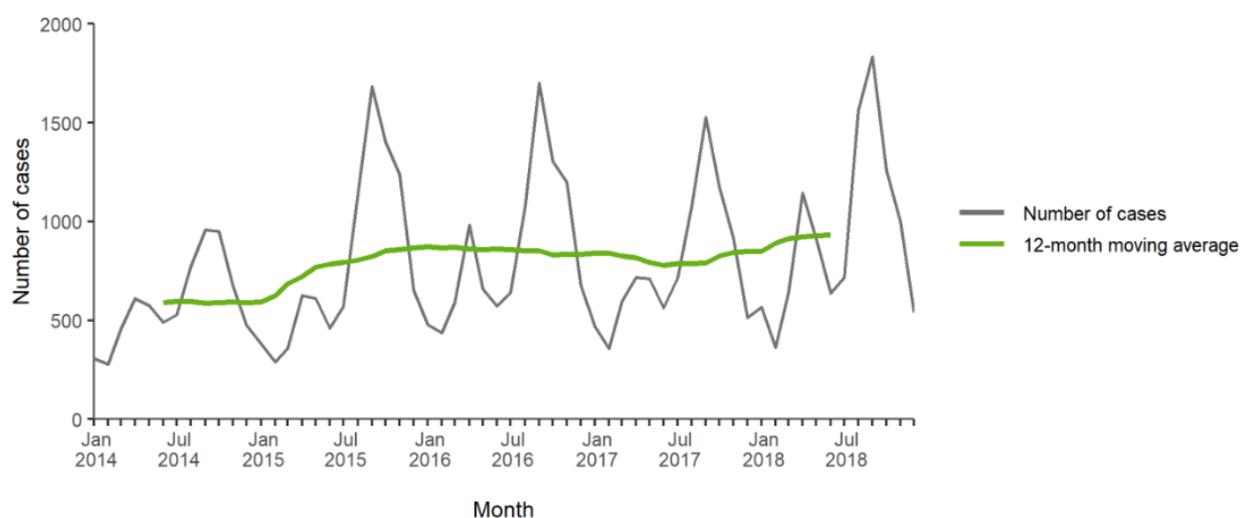
Les épidémies de cryptosporidiose ont un coût économique considérable. Le coût de la plus grande épidémie qui a eu lieu en 1993, a été estimé à plus de 96,2 millions de dollars (Corso *et al.*, 2003). En Irlande, le coût d'une épidémie qui s'est déroulée en 2007 (242 cas confirmés) a été estimé à 19 millions d'euros (Chyzheuskaya *et al.*, 2017). Afin d'estimer le coût de ces épidémies, ont été pris en compte, le coût des hospitalisations, des transports (ambulances), des traitements, la perte de productivité du malade (arrêt de travail, hospitalisation) et des soignants et pour l'épidémie qui a eu lieu en Irlande, a été pris en compte également, l'achat de bouteilles d'eau, le coût de l'équipe d'intervention et les coûts encourus par les autorités locales (Chyzheuskaya *et al.*, 2017; Corso *et al.*, 2003). À cela s'ajoute parfois la nécessité d'effectuer des travaux coûteux pour mettre en place des moyens efficaces de traitement des systèmes de distribution d'eau potable (tel que des stations UV...).

Les pertes économiques se répercutent également sur les élevages d'animaux, avec pour exemple une surmortalité chez les animaux infectés par *Cryptosporidium* spp., une diminution de la croissance (jusqu'à 34 kg de gains de poids en moins) chez les veaux atteints de cryptosporidiose par rapport aux veaux non malades (Zahedi and Ryan, 2020).

Saisonnalité

Les saisons jouent un rôle dans la contamination des populations et l'apparition d'épidémies. En effet, il a été montré que les variables climatiques telles que la température, l'humidité relative et les précipitations étaient significativement associées à une augmentation de l'incidence de la cryptosporidiose (Ikiroma and Pollock, 2021). En Angleterre, une augmentation saisonnière a été décrite à la fin du printemps, de l'été et au début de l'automne. L'augmentation des cas au printemps due à *C. parvum* serait principalement attribuée à la contamination de l'environnement par les oocystes excrétés par les jeunes animaux puisque cette période coïncide avec les saisons de vêlage et d'agnelage (Cacciò and Pozio, 2006; McLauchlin *et al.*, 2000). Cette contamination étant accentuée à la suite de fréquentes précipitations (Naumova *et al.*, 2005). En effet, les fortes précipitations peuvent faciliter le ruissellement des oocystes contaminant les sources d'eau de surface et d'eau potable (Gertler *et al.*, 2015; Lal *et al.*, 2012). L'augmentation des cas à la fin de l'été serait principalement due à *C. hominis* et a été attribuée à l'augmentation des voyages et à l'exposition à des eaux de loisirs contaminées par l'Homme (Cacciò, 2005; Xiao, 2010).

Les prévalences élevées des infections à *C. parvum* au printemps et à *C. hominis* en été/automne ont également été décrites en Nouvelle-Zélande, au Canada, en Irlande et aux Pays-Bas (Budu-Amoako *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2018; Sopwith *et al.*, 2005; Wielinga *et al.*, 2008).



Source: Country reports from Cyprus, Czechia, Estonia, Finland, Germany, Hungary, Iceland, Ireland, Latvia, Lithuania, Malta, Norway, Poland, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom.

Figure 12: Distribution des cas confirmés de cryptosporidiose par mois en Europe entre 2014 et 2018 (ECDC, 2019).

En France, une augmentation des contaminations estivales a été observée chaque année entre juillet et octobre (figure 13). *C. parvum* est la principale espèce responsable d'infections humaines, peu importe la saison (72% des cas). Cependant, à la fin de l'été *C. hominis* représente tout de même 64% des cas signalés probablement dus, comme en Angleterre, aux voyages et aux eaux de loisirs (Costa *et al.*, 2020). La répartition des cas en France est donc cohérente avec celle déjà décrite en Europe.

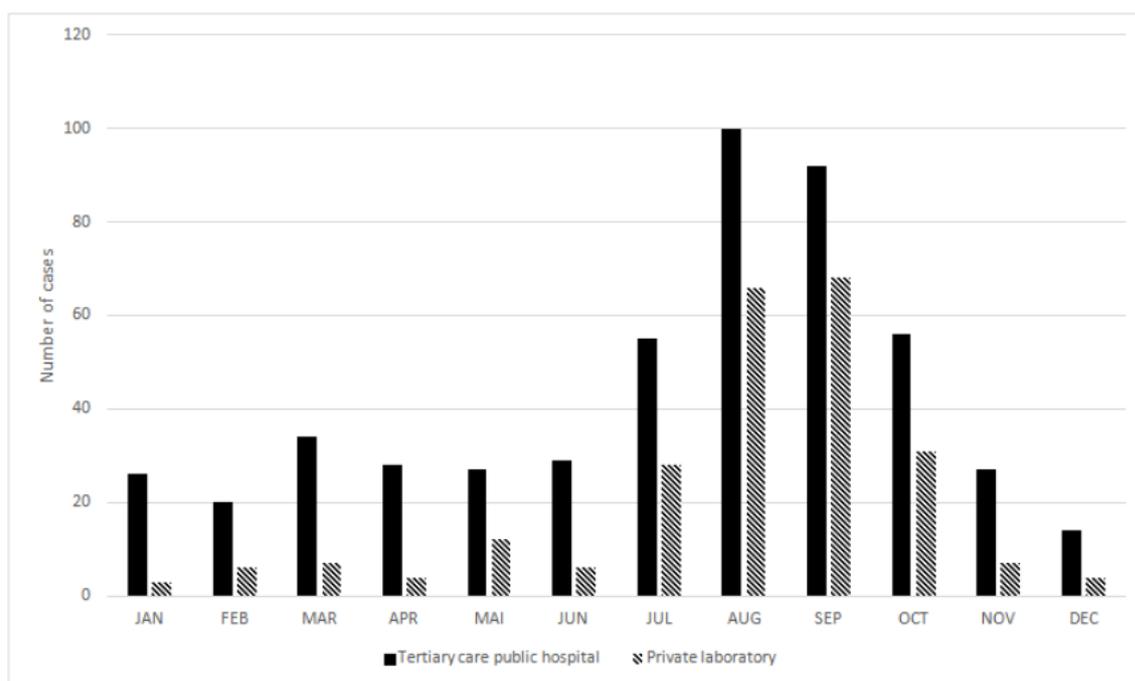


Figure 13: distribution annuelle des cas de cryptosporidiose en France entre 2017 et 2019 (Costa *et al.*, 2020)

1.10.1 Épidémies liées à l'eau

Les parasites protozoaires sont à l'origine d'épidémies hydriques, entraînant 4 milliards de cas de diarrhées et 1,6 million de décès par an (Zahedi *et al.*, 2015).

Au total, 905 épidémies d'origine hydrique liées à un parasite protozoaire ont été décrites dans le monde entre 1900 et 2016. Entre 2011 et 2016, *Cryptosporidium* était, à lui seul, à l'origine de 63% des épidémies d'origine hydrique, soit 381 épidémies signalées dans le monde entier (Efstratiou *et al.*, 2017). L'autre parasite principalement retrouvé était *Giardia duodenalis* représentant 37% des épidémies.

En termes de répartition mondiale, entre 2011 et 2016, la moitié (48%) des épidémies d'origine hydrique causées par des protozoaires dans le monde entier l'ont été en Nouvelle-Zélande. L'Amérique du Nord représentait 41% des foyers épidémiques rapportés. Ces taux élevés en Amérique du Nord et en Nouvelle-Zélande sont probablement dus au fait que dans ces pays il existe des systèmes de surveillance et de déclaration obligatoire de la cryptosporidiose. L'Europe représentait 9% des foyers épidémiques décrits (2,4% en Irlande, 5,5% au Royaume uni, moins de 1,3% en Europe continentale (Norvège, suède, Belgique et Allemagne)) et l'Asie, 1% (en République de Corée et en Chine)(Efstratiou *et al.*, 2017).

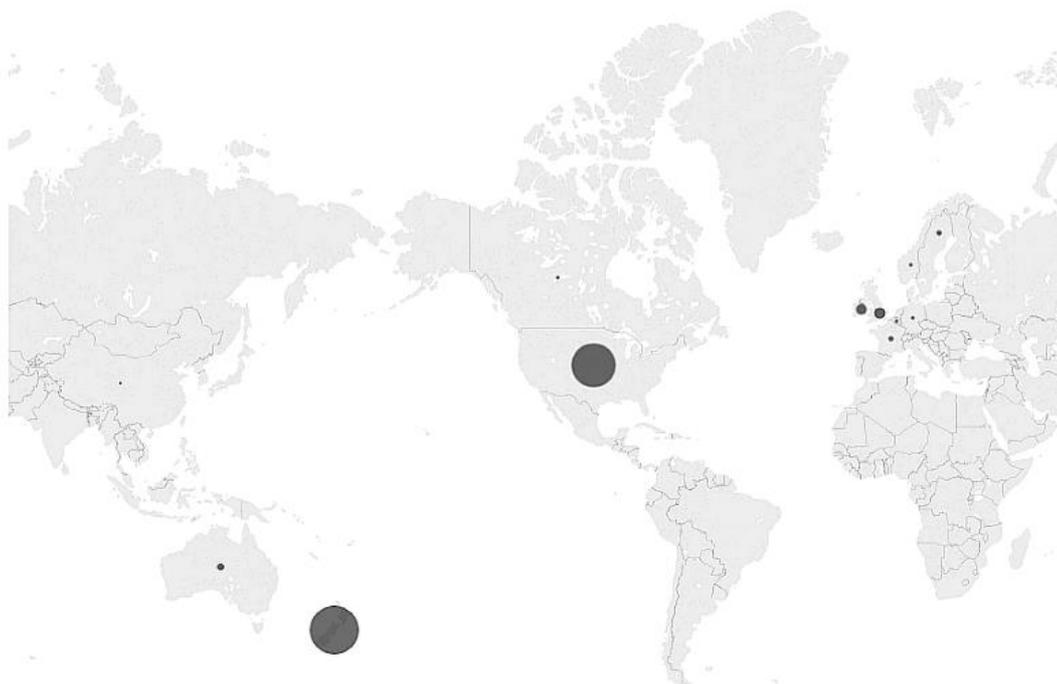


Figure 14: Distribution globale des épidémies de cryptosporidiose et de giardiose d'origine hydrique rapportées dans le monde (Efstratiou *et al.*, 2017)

Le parasite du genre *Cryptosporidium* était responsable de plus de 524 épidémies d'origine hydrique entre le début du siècle dernier et 2016 (Zahedi and Ryan, 2020). La première épidémie liée à l'eau a été décrite en 1984 au Texas et était liée à la contamination d'une nappe phréatique par des eaux usées (Chalmers, 2012; D'Antonio *et al.*, 1985). L'épidémie qui reste la plus connue et la plus importante de cryptosporidiose s'est produite en 1993 à Milwaukee dans le Wisconsin aux États-Unis ou de l'eau potable provenant du lac Michigan a été contaminée par des oocystes de *Cryptosporidium* qui ont traversé le système de filtration d'une station de traitement des eaux du à la défaillance d'un filtre entraînant la contamination de plus de 400 000 personnes et près de 4000 hospitalisations et 69 décès (Mac Kenzie *et al.*, 1994).

La contamination par les eaux de loisirs et la première cause de contamination par *Cryptosporidium* aux États-Unis et au Royaume uni (CDC, 2011; Smith *et al.*, 2006). En effet aux États-Unis, 94 % des épidémies d'origine hydrique étaient liées à de l'eau récréative traitée ou non (piscine, lacs, rivières..) et 6% à de l'eau de boisson (Gharpure, 2019).

Entre 2010 et 2020, la majorité des épidémies de cryptosporidiose d'origine hydriques dans le monde ont été causées par *C. hominis* (72,2%) contrairement aux épidémies d'origine alimentaire qui ont été causées par *C. parvum* (96,5%) (Zahedi and Ryan, 2020). *C. parvum* et *C. hominis* sont responsables de toutes les épidémies liées à l'eau connues à l'exception d'une épidémie liée à *C. cuniculus* en Angleterre (Zahedi and Ryan, 2020)

En raison des épidémies hydriques liées à *Cryptosporidium*, sa recherche dans les ressources en eau potable est désormais obligatoire dans de nombreux pays industrialisés, comme aux États-Unis, au Canada, en Australie ou encore au Royaume-Uni (Chalmers, 2012).

1.10.2 Épidémies alimentaires

En 2010, sur environ 104 millions de cas de diarrhées d'origine alimentaire liées à un parasite, les protozoaires ont été responsables de la majorité des cas soit 77,5 millions et *Cryptosporidium* dans 8,6 millions de cas (Ryan *et al.*, 2018; Zahedi *et al.*, 2015).

Dans un récent classement conjoint de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation mondiale de la santé, *Cryptosporidium* était classé cinquième sur 24 parasites à risque d'infection d'origine alimentaire (FAO/OMS, 2014), dépassé seulement en importance par *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* et *Toxoplasma gondii*.

La contamination par les oocystes de *Cryptosporidium* peut facilement se produire à n'importe quelle étape de la transformation des aliments, de la ferme à la table (contamination directe par des fèces ou par des manipulateurs d'aliments infectés) (Åberg *et al.*, 2015; Hohweyer *et al.*, 2016; McKerr *et al.*, 2015; Utaaker *et al.*, 2017). Le lait non pasteurisé, le cidre de pomme non pasteurisé et les différentes salades figurent parmi les aliments les plus fréquemment impliqués dans les épidémies d'origine alimentaire (Ryan *et al.*, 2018).

L'OMS a classé *Cryptosporidium* parmi les pathogènes émergents constituant une menace pour la santé publique (Keusch *et al.*, 1995). De plus l'impact de *Cryptosporidium* en santé publique est telle qu'aujourd'hui *C. parvum* et *C. hominis* ont été inclus dans la catégorie B des agents infectieux avec un potentiel de bioterrorisme (Widmer and Sullivan, 2012)

1.11 Résistances des oocystes de *Cryptosporidium*

De nombreuses études ont permis d'évaluer la résistance des oocystes dans l'environnement ou aux procédés de traitements de l'eau en étudiant leur viabilité et leur infectiosité grâce au modèle animal, à la culture cellulaire, ou à la microscopie (dékystement / colorants vitaux (DAPI/IP)).

1.11.1 Facteurs influençant la survie des oocystes dans l'environnement

La persistance des oocystes dans les matrices environnementales peut être influencée par l'âge des oocystes. Les oocystes âgés sont plus fragiles aux changements environnementaux et aux désinfectants chimiques (Carey *et al.* 2004). D'autres facteurs influencent la survie des oocystes dans l'environnement comme la température, l'ammoniaque, l'antagonisme biotique, le pH, la dessiccation, la matrice du sol, la végétation et les paramètres hydrologiques (King and Monis, 2007). Les effets de ces différents facteurs sont décrits dans les paragraphes suivants.

Dans l'eau potable et de rivière, la survie des oocystes peut aller jusqu'à 176 jours bien qu'une inactivation allant de 89 à 99% des oocystes ait été rapportée (Chalmers, 2014; Robertson *et al.*, 1992). Il a ainsi été décrit que les oocystes pouvaient rester viables et infectieux plusieurs mois à des températures comprises entre + 0 et + 30°C. Dans l'eau de distribution, il a été montré qu'à + 10°C, 67%, 48% et 27% des oocystes sont restés viables durant 4, 6 et 8 semaines respectivement. A + 4°C ils sont restés viables à 95%, 90% et 88% (Afssa, 2002; Fayer *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1992).

Il a été montré que les oocystes pouvaient rester viables jusqu'à un an dans l'eau de mer à + 6-8°C (Fayer *et al.*, 1998; Tamburrini and Pozio, 1999). Les oocystes maintenus à + 20°C étant infectieux à des salinités de 0 et 10 ppt (part per thousand) pendant 12 semaines, 20 ppt pendant 4 semaines et 30 ppt pendant 2 semaines (Fayer *et al.*, 1998). La survie importante dans l'eau de mer entraîne un risque potentiel de cryptosporidiose par ingestion et notamment par consommation de fruits de mer tels que des huitres, palourdes ou moules peu cuites (Fayer *et al.*, 1998; Graczyk and Schwab, 2000; Tamburrini and Pozio, 1999).

À température ambiante, dans l'eau, il a été montré que les oocystes restaient viables et infectieux de nombreuses semaines, même si les durées variaient selon les études (tableau VII) et que les méthodes d'évaluation de l'infectiosité et de la viabilité étaient différentes (modèle animal (souris) ou culture cellulaire). En effet, la survie des oocystes a été décrite jusqu'à 7 mois à +15°C et jusqu'à 24 semaines à +20°C et 12 semaines à +25°C (Fayer *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2003). Cependant, d'autres résultats ont montré une inactivation des oocystes après 12 et 8 semaines à +20 et +25 °C respectivement (King *et al.*, 2005).

Tableau VII: effet des températures ambiantes sur la viabilité et l'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium*

Température	durée	Méthode d'évaluation de l'infectiosité/viabilité	Infectiosité/viabilité	référence
+15°C	12 semaines	Culture cellulaire	Viables et infectieux	(King <i>et al.</i> , 2005)
	< 24 semaines	Modèle animal		(Fayer <i>et al.</i> , 1998)
	7 mois	Modèle animal et culture cellulaire		(Jenkins <i>et al.</i> , 2003)
+20°C	< 12 semaines	Culture cellulaire	99.99% non viables ni infectieux	(King <i>et al.</i> , 2005)
	< 24 semaines	Modèle animal	Viables et infectieux	(Fayer <i>et al.</i> , 1998)
+25°C	< 12 semaines			(Fayer <i>et al.</i> , 1998)
	< 8 semaines	Culture cellulaire	99.99% non viables ni infectieux	(King <i>et al.</i> , 2005)

Plusieurs études utilisant plusieurs méthodes d'évaluation de l'infectiosité et de la viabilité (culture cellulaire, modèle animal, DAPI/IP) ont montré que les oocystes étaient très sensibles à la chaleur comme le montre le tableau VIII. À partir de 37°C, les oocystes sont inactivés au bout de 72h et à partir de 60 °C, l'inactivation est beaucoup plus rapide et est inférieure à 2 minutes.

Tableau VIII: Effets de la chaleur sur la viabilité et l'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium*

Température	durée	Infectiosité/viabilité	référence
30°C	500 heures	Non viables ni infectieux	(King <i>et al.</i> , 2005)
37°C	72 heures		
45°C	20 min	> 99% non viables ni infectieux	(King and Monis, 2007)
60°C	45 secondes	Non infectieux	(Moriarty <i>et al.</i> , 2005)
64,2°C	2 minutes		(Fayer, 1994)
72,4°C	1 minute		
75°C	20 secondes		(Moriarty <i>et al.</i> , 2005)

Les oocystes sont également sensibles à la congélation comme le montre le tableau IX. Les oocystes restent viables jusqu'à 168h à -10°C (modèle animal) mais seulement jusqu'à 5h à -20 °C (DAPI/PI). Pour des températures très faibles les oocystes sont vite inactivés (1 heure à -70°C).

Tableau IX: Effets des basses températures sur la viabilité et l'infectiosité des oocystes de *Cryptosporidium*

Température	durée	Infectiosité/viabilité	référence
-10°C	168 heures	Viables et infectieux	(Fayer and Nerad, 1996)
	50 jours dans le sol	99% non viables ni infectieux	(Kato <i>et al.</i> , 2002)
- 15°C	8 et 24 heures	Viables et infectieux	(Fayer and Nerad, 1996)
-20°C	24 heures	Non viables ni infectieux	(Fayer and Nerad, 1996)
	1, 3 et 5 heures	Viable et infectieux	
-22°C	21 heures	67% non viables	(Robertson <i>et al.</i> , 1992)
	152 heures	> 90% non viables ni infectieux	
-70°C	1, 8, et 24 heures	Non viables ni infectieux	(Fayer and Nerad, 1996)

Les oocystes sont donc résistants aux températures de congélation et sont donc capables de résister dans les glaçons qui sont généralement congelés entre -15°C et -20°C pendant quelques heures (Carey *et al.*, 2004; Fayer and Nerad, 1996).

Le réchauffement climatique pourrait donc intervenir sur l'épidémiologie de la cryptosporidiose par une augmentation des cas dans les zones aujourd'hui les plus froides du globe. (King and Monis, 2007).

Les oocystes sont très sensibles à la dessiccation. En effet, deux études ont rapporté que seulement 3% et 5 % des oocystes restaient viables après avoir été séchés respectivement 2h et 4h à température ambiante (Deng and Cliver, 1999; Robertson *et al.*, 1992)

La viabilité des oocystes dans les fèces humains et de veaux a été étudiée grâce au DAPI/PI. À +4°C, dans les matières fécales humaines, 22% des oocystes étaient toujours viables après 6 mois. Entre +5°C et + 10°C, chez les veaux, 34% des oocystes étaient toujours viables après 6 mois (Robertson *et al.*, 1992). Une autre étude a montré une viabilité de 10% et de 14% des oocystes après 410 et 259 jours respectivement après conservation à +4°C des selles de veaux infectés (Jenkins *et al.*, 1997).

L'ammoniaque est présent naturellement dans l'environnement mais provient également, de manière importante, des engrais, des déchets humains et d'animaux et des sous-produits des procédés de fabrication industriels. Il a été observé que les oocystes n'étaient plus infectieux chez la souris après avoir été exposé à une atmosphère contenant de l'ammoniaque pur à température ambiante pendant 24h (Fayer and Nerad, 1996). Il a ainsi été montré qu'une concentration suffisante en ammoniaque pouvait augmenter de façon significative l'inactivation des oocystes. Il se trouve que dans le fumier en décomposition, en particulier dans les entrepôts de fumier, une concentration importante en ammoniaque est fréquemment retrouvée. Le stockage de fumier en zone close serait donc une possible stratégie pour réduire l'infectiosité des oocystes dans les déchets d'élevage avant l'épandage sur le sol (Hutchison *et al.*, 2005; King and Monis, 2007). Pour inactiver 99,99% des oocystes, une exposition à de l'ammoniaque à la concentration de 0,06M pendant 8,2 jours à +24°C serait nécessaire (Jenkins *et al.*, 1998). Ou bien une concentration de 2000 mg/L pendant 5 à 6 jours pourrait éliminer 100% des oocystes (Walker *et al.*, 1998)

Une étude du mouvement de *C. parvum* à travers plusieurs types de sols (argileux, limoneux et sableux), réalisée en laboratoire, a montré que les oocystes sédimentaient dans le sol pendant plusieurs semaines et dans certains cas pendant plus de 70 jours. La plupart des oocystes ont été trouvés dans les 2 cm supérieurs du sol, leur nombre diminuant avec la profondeur. Des oocystes ont été retrouvés à 30 cm mais aucun à 70 cm (King and Monis, 2007; Mawdsley *et al.*, 1996).

La végétation joue un rôle dans la rétention des oocystes. En effet, il a été démontré que des zones tampons de prairie de seulement 1,1 à 2,1 m de large génèrent entre 3 et 8 logs de rétention des oocystes de *Cryptosporidium* (Atwill *et al.*, 2006).

La température du sol joue un rôle dans la survie des oocystes. En effet, les oocystes présents dans des sols à + 4°C peuvent rester infectieux pendant de très longues périodes voir des années (Davies *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2002).

Une fois les oocystes dans la matrice sol, ils sont protégés de la dessiccation contrairement aux oocystes présents au-dessus du sol. En effet, dans le sol, les oocystes sont protégés grâce à la terre et à la végétation. La terre atténue l'action des agents physico-chimiques et la végétation favorise le micro-enfouissement des oocystes dans le sol. Les oocystes persistent ainsi plus longtemps à la même température dans le sol que dans l'eau (Jenkins *et al.*, 2002). Il a été rapporté que les oocystes se déplacent avec les eaux de ruissèlement (Dai and Boll, 2003).

L'exposition aux UV a été identifiée comme étant préjudiciable à un large éventail d'organismes, y compris les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux que ce soit au niveau de l'environnement terrestre qu'aquatique. Les oocystes présents dans les environnements terrestres et aquatiques sont sujets à l'inactivation solaire (King and Monis, 2007). L'effet de l'inactivation solaire de *Cryptosporidium* dans l'eau a montré une réduction de 90% de la viabilité (évaluée par dékystement) après une période d'exposition de 3 jours (Johnson *et al.*, 1997). Une autre étude a mis en évidence une inactivation rapide des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau destinée à la consommation humaine, avec une inactivation pouvant atteindre 90 % au cours de la première heure les jours où l'indice UV était le plus élevé (King *et al.*, 2008).

Des expériences en bassin extérieur ont également identifié une inactivation rapide des oocystes dans des eaux environnementales de qualité variable, avec une inactivation allant jusqu'à 2 log enregistrée un jour d'hiver et jusqu'à 3 log enregistrée un jour d'été pour *C. parvum* (King *et al.*, 2008).

Dans la littérature, des interactions entre *Cryptosporidium* et les rotifères, les ciliés, les amibes libres, les gastro-entéropathes et les plathelminthes ont été décrites. En effet, il a été montré que ces microorganismes étaient capables d'ingérer des oocystes (R. Fayer *et al.*, 2000; Huamanchay *et al.*, 2004; King and Monis, 2007; Stott *et al.*, 2003, 2001). L'agglutination des oocystes a d'ailleurs été observée dans l'eau brute alors que dans l'eau stérile aucune agglutination n'a été observée. Cette agglutination serait possiblement due à une réponse face à la prédation des oocystes par d'autres microorganismes (King *et al.*, 2005).

En ce qui concerne les bactéries ou plus précisément les biofilms, peu d'études ont été réalisées sur leurs interactions avec *Cryptosporidium*. Lors d'une épidémie de cryptosporidiose en Angleterre en 2000, les oocystes sont restés détectables jusqu'à 19 jours après le changement de la source d'alimentation contaminée et des pics ont même été observés après l'utilisation de bornes à incendies possiblement dû à l'évacuation de l'eau avec beaucoup plus de force entraînant un détachement du biofilm et la libération d'oocystes. L'hypothèse d'un lien entre biofilm et rétention d'oocystes a donc été évoquée (Howe *et al.*, 2002).

1.11.2 Résistance aux traitements de désinfection de l'eau

La qualité de l'eau brute conditionne le type de traitement à instaurer pour obtenir une eau potable. De nombreux procédés industriels sont aujourd'hui utilisés pour la production d'eau potable (Drozd, 1996). On peut citer la coagulation-floculation qui permet l'élimination des matières en suspension et des colloïdes en les rassemblant sous forme de floc dont la séparation est ensuite effectuée par des systèmes de décantation, par flottation et/ou filtration. La filtration permet de filtrer les particules en suspension qui sont microscopiques ; elle est réalisée sur sables ou adsorbants (charbons actifs en grain ou en poudre) ou à l'aide de membranes de diamètres de pores variées (micro, ultra ou encore nanofiltration).

L'efficacité de divers traitements sur l'élimination des oocystes de *Cryptosporidium* est présentée dans le tableau X.

Tableau X: efficacité, exprimée en réduction logarithmique décimale, des différentes étapes de traitement de l'eau concernant l'élimination de *Cryptosporidium* sp. et *Giardia* sp. en fonction de la turbidité en sortie d'étape de traitement (source: (Baudin *et al.*, 2001) non publié) (Afssa, 2002).

Etape de traitement	Niveau de turbidité NTU	Elimination (réduction logarithmique décimale) de <i>Cryptosporidium</i> et <i>Giardia</i>
Sédimentation simple	< 1	< 0,5
Filtration simple	< 0,5	0,5 à 1
Coagulation/floculation /décantation	< 2	0,5
Décantation lamellaire	< 1,5	0,5 à 1
Coagulation sur filtre	< 0,5	2
Décantation/lit de boue pulsée	< 1	1,5 à 2
Décantation/floc lesté	< 1	1,5 à 2
Flottation	< 0,5	2 à 3
Coagulation/floculation/ séparation/filtration	< 0,1	3 à 4
Filtration lente biologique	< 0,1	4
Filtration terre de diatomée	< 0,1	4 à 5
Floculation/décantation/ filtration lente	< 0,1	4 à 5
Microfiltration 0,5µm	< 0,1	> 5
Ultrafiltration	< 0,1	> 5

Effets des désinfectants sur les oocystes de *Cryptosporidium*

Classiquement, cinq désinfectants sont utilisés pour le traitement de l'eau potable : le chlore libre, le monochloramine, l'ozone, le dioxyde de chlore et les rayons UV.

À l'exception des rayons UV qui utilisent la radiation électromagnétique, ce sont tous des agents anti-oxydants. Les UV endommagent l'acide nucléique des oocystes empêchant leur réplication. Les désinfectants chimiques agissent sur les oocystes en détruisant ou endommageant la structure de leurs cellules, leur métabolisme, leur biosynthèse et leur croissance (Canada, 2005)

Le chlore libre

La plupart des microorganismes sont sensibles au chlore, à la concentration utilisée en station de production d'eau potable (5 mg/L environ) contrairement à *Cryptosporidium* spp. Il a été montré qu'une concentration de 8 à 16 g/L soit 8000 à 16 000 ppm de chlore pendant 24h était nécessaire pour que les oocystes soient complètement inactivés comme le montre le tableau XI (Drozd, 1996; Smith *et al.*, 1989).

Il a été montré que pour obtenir une inactivation de 99% (soit 2 log₁₀) des oocystes de *Cryptosporidium* spp., il fallait un Ct de 7200 mg/L.min-1 (Chauret *et al.*, 2001; Korich *et al.*, 1990). Le Ct permet de prédire l'efficacité d'un traitement désinfectant chimique d'après sa concentration résiduelle (Canada, 2005). C correspond à la concentration résiduelle du désinfectant en mg/L et t correspond au temps de contact avec le désinfectant en minutes.

Il a également été montré que les oocystes étaient très résistants à l'hypochlorite de sodium (5.25%) même après un temps de contact prolongé pendant 120 min à 21°C (Fayer, 1995).

Tableau XI : Effets du chlore libre sur l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium*

Concentration en chlore libre	Durée et température	% inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	références
80 mg/L (80 ppm)	2h à 25°C	99	(Korich <i>et al.</i> , 1990)
8 à 16 g/L (8000 à 16 000 ppm)	24h	100	(Smith <i>et al.</i> , 1989)
1g/L (1000 ppm)	24h à 10°C	70,5	(Ransome <i>et al.</i> , 1993)

La monochloramine

La monochloramine est utilisée en générale uniquement dans la désinfection secondaire en raison de son faible pouvoir oxydant. *Cryptosporidium* est également très résistant à ce biocide, sa résistance est comparable avec celle du chlore (Korich *et al.*, 1990).

Dioxyde de chlore

Le dioxyde de chlore est l'agent de chloration le plus efficace. Pour éliminer 90% des oocystes il faudrait 1,3 mg/L (1,3 ppm) pendant 1h alors que pour obtenir le même résultat, il faudrait 80 mg/L (80 ppm) de chlore pendant 90 minutes. Cependant, des limites à 0,5 mg/ L (0,5 ppm) de dioxyde de chlore ont été fixées pour désinfecter l'eau pour éviter la formation de sous-produits qui pourrait être toxiques. Pour inactiver 99% des oocystes il a été montré qu'un Ct de 75 à 1000 mg.min/L était nécessaire en dioxyde de chlore (Chauret *et al.*, 2001).

Tableau XII : Effet de lu Dioxyde de chlore sur l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium*

Concentration en dioxyde de chlore	Durée	% inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	références
0,43 mg/L (0,43 ppm)	15-30 min	64-69 %	(Peeters <i>et al.</i> , 1989)
0,49 mg/L (0,49 ppm)	30 min	63,8 %	(Ransome M.E. <i>et al.</i> , 1993)
4,97 mg/L (4,97 ppm)	15 min	95,8 %	
1,3 mg/L (1,3 ppm)	1h	90 %	(Korich <i>et al.</i> , 1990)

Ozone

L'ozone semble efficace dans l'inactivation des oocystes comme le montre le tableau XIII. En effet, il a été montré qu'une dose d' 1mg/L pendant 10 minutes pouvait inactiver 99% des oocystes (Korich *et al.*, 1990). Il a également été montré que pour inactiver 99% des oocystes le Ct devrait être de 3,5 mg.min.L-1 à 20°C (Finch *et al.*, 1993).

Cependant, la température est un facteur important à prendre en compte car à +5°C l'efficacité de l'ozone décroît. Ce phénomène serait expliqué par la plus grande perméabilité de la paroi des oocystes à des températures élevées permettant de faciliter l'accès au désinfectant (Parker *et al.*, 1993).

Tableau XIII : Effet de l'ozone sur l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium*

Concentration d'ozone	Durée	% inactivation des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>	références
2,25 mg/L (2,25 ppm)	8 min	99	(Peeters <i>et al.</i> , 1989b)
1 mg/L (1 ppm)	10 min	99	(Korich <i>et al.</i> , 1990)
		> 95	(Ransome <i>et al.</i> , 1993)
5 mg/L (5 ppm)	5 min	75-100	(Parker <i>et al.</i> , 1993)
1,11 mg/L (1,11 ppm)	5 min	100	(Peeters <i>et al.</i> , 1989)

UV

Après l'action des UV, qui endommagent l'acide nucléique des oocystes, il a été montré que les dimères de pyrimidine pouvaient être réparés dans l'ADN mais que cette réparation n'a pas permis aux oocystes de récupérer leur infectiosité (Betancourt and Rose, 2004; Morita *et al.*, 2002; Oguma *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2001).

Les doses nécessaires pour inactiver de 90 à 99% des oocystes sont très élevées et nécessitent des expositions respectives à 80 et 120 mW.S.cm⁻², à titre indicatif les doses utilisées classiquement dans le traitement des eaux sont environ de 30 mW.s.cm⁻² (Ransome *et al.*, 1993)

D'après plusieurs études, l'US EPA (United States Environmental Protection Agency) a établi les doses de rayonnement UV nécessaires pour inactiver *Cryptosporidium* (Tableau XIV). Il a été démontré que des doses comprises entre 5,8 et 22 mJ/cm² inactivaient 2-4 log₁₀ (99-99,9%) d'oocystes de *C. parvum* (Canada, 2005; US EPA, 2006)

Tableau XIV: Dose de rayons UV (mJ/cm²) nécessaires pour une inactivation des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* pouvant atteindre 4 log₁₀ (99,99 %) (US EPA, 2006)

Inactivation logarithmique	Dose de rayons UV (mJ/cm ²) nécessaire pour l'inactivation	
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia lamblia</i>
0,5	1,6	1,5
1	2,5	2,1
1,5	3,9	3,0
2	5,8	5,2
2,5	8,5	7,7
3	12	11
3,5	15	15
4	22	22

2 Amibes libres

2.1 Définition

Les amibes, au sens large, désignent un ensemble de microorganismes eucaryotes unicellulaires hétérotrophes partageant des caractéristiques morphologiques et comportementales communes comme le fait de se déplacer par projections cytoplasmiques (Delafont, 2006; Loret and Greub, 2010). Les amibes descendent d'une forme de vie datant d'environ 2 milliards d'années, représentant probablement l'une des premières émergences de la vie eucaryote (Delafont, 2006; Stanley, 1973).

Plus de 5000 espèces d'amibes libres sont actuellement décrites et la présence d'environ 25 000 espèces amibiennes différentes ont été estimées réparties au sein de plusieurs super règnes (Adl *et al.*, 2007; Delafont, 2006).

On différencie les amibes libres des amibes parasites. Les amibes parasites ont besoin d'infecter un hôte pour survivre et se développer et sont retrouvées essentiellement dans le tube digestif de l'Homme et des mammifères comme *Entamoeba histolytica* qui est responsable de la dysenterie amibienne (Delafont, 2006). Les amibes libres vivent et se multiplient librement dans l'environnement de manière autonome sans hôte (Schuster and Visvesvara, 2004). Certaines amibes libres sont capables d'amphizoïdie, c'est à dire qu'elles peuvent être soit libres dans le milieu extérieur ou soit parasites de l'animal ou de l'homme et provoquer des maladies rares pouvant être graves (Coulon, 2011; Fouque, 2013; Kot *et al.*, 2018).

Dans cette étude bibliographique, nous allons essentiellement nous intéresser à *A. castellanii* et *V. vermiformis* qui font parties des amibes libres les plus retrouvées dans l'environnement (Loret and Greub, 2010).

2.2 Histoire

La première description d'une amibe libre a été publiée en 1755 par Rosenhof mais c'est seulement en 1953 que l'observation microscopique d'une amibe libre a été réalisée par Henry Baker (Rosenhof, 1755).

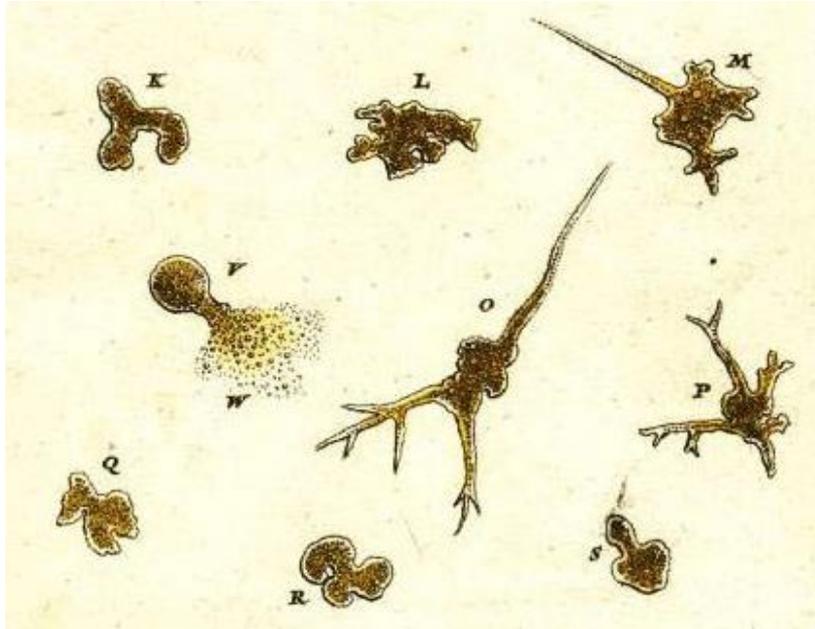


Figure 15: première illustration d'une amibe (Augustus Iohannes Roesel von Rosenhof, 1755)

Le terme amibe qui veut dire « changeant » en grecque a été utilisé pour la première fois en 1826 du fait de l'observation « d'un corps membraneux diffluent et très contractile n'ayant de forme que celle qu'il veut bien se donner » (Bory de Saint-Vincent *et al.*, 1826; Visvesvara *et al.*, 2007).

En 1913 Puschkarew a isolé une amibe libre de la poussière, qu'il a nommé *Amoeba polyphagus*. Cette amibe a ensuite été renommé en *Acanthamoeba polyphaga* par Page en conservant la désignation générique *Acanthamoebae* créée par Volonsky en 1931 (Ubelaker, 1991; Visvesvara *et al.*, 2007).

En 1930 Castellani a isolé une amibe libre dans une culture de levure qu'il a nommé *A. castellanii* (Visvesvara *et al.*, 2007).

En 1958, Culbertson a décrit le concept selon lequel les amibes libres vivant en liberté pouvaient causer des infections humaines. En effet, au cours de la production du vaccin contre la poliomyélite, une amibe a été isolée à partir de cultures de tissus rénaux de singes. Les chercheurs ont d'abord pensé que cette amibe était un virus inconnu et l'ont inoculé par voie intra cérébrale à des souris et à des singes traités à la cortisone. Les animaux sont morts une semaine après l'infection et des amibes ont été retrouvées dans les lésions cérébrales. Culbertson a donc émis l'hypothèse

qu'une infection similaire pouvait exister chez l'homme et a nommé l'amibe *A. culbertsoni* (Culbertson *et al.*, 1959, 1958).

C'est seulement en 1965 que le pouvoir pathogène des amibes libres a réellement été décrit chez l'Homme. En effet, des amibes libres ont été retrouvées dans le cerveau de personnes décédés de méningo-encéphalites (Butt, 1966; Fowler and Carter, 1965). La maladie fut nommée méningo-encéphalite amibienne primitive, elle fut également attribuée en 1968 à *Naegleria fowleri* (Butt, 1966; Butt *et al.*, 1968). En 1972, un autre cas de méningo-encéphalite amibienne a été décrit du à *A. culbertsoni*, on la nomma cette fois encéphalite granulomateuse amibienne (EGA) pour la différencier des encéphalites à *N. fowleri* (Willaert *et al.*, 1978).

En 1975, le rôle du genre *Acanthamoeba* dans les kératites a été démontré (Jones *et al.*, 1975).

La capacité des amibes libres à phagocyter divers microorganismes et leur résistance à cette phagocytose a été décrite en 1956, où il a été observé la présence de bactéries intracellulaires capables de lyser les amibes (Drozański *et al.*, 1984). En 1978, fut évoqué le rôle de réservoirs des amibes libres vis à vis de certaines bactéries pathogènes (Barker and Brown, 1994). Depuis, de nombreuses études ont montré le rôle des amibes libres dans la phagocytose, la survie et la dissémination de nombreux microorganismes pathogènes ou non comme *Legionella pneumophila* (Greub and Raoult, 2004; Scheid, 2018; Thomas *et al.*, 2010).

2.3 Taxonomie

Depuis 1926, date de la première classification des amibes libres basée sur la morphologie en microscopie optique plusieurs classifications ont été proposées (Bolivar *et al.*, 2001; schaeffer, 1926; Smirnov *et al.*, 2005, 2011).

En 1987, une classification associant caractéristiques biologiques, physiologiques et ultrastructurales a été développée par Page (Bouyer, 2008; Page, 1987). Cette classification a régulièrement été révisée grâce à la biologie moléculaire.

Taxonomie d'*Acanthamoeba*

Le genre *Acanthamoeba* appartient aux *Centramoeba* au sein des *Discosea* (Adl *et al.*, 2019). Morphologiquement, trois groupes d'amibes libres du genre *Acanthamoeba* ont été décrits, le groupe I, II et III. Les espèces pathogènes étant retrouvées dans le groupe II (Kot *et al.*, 2018).

En se basant sur la biologie moléculaire, en ARNr 18S : au moins 22 génotypes ont été décrits (T1 à T22). Les amibes libres du genre *Acanthamoeba* appartenant aux génotypes T2-T6, T10, T11 et T15 ont déjà été décrites comme responsables de kératites tandis que les génotypes T1, T2, T4, T5, T10 et T12 l'ont été pour l'Encéphalite Granulomateuse Amibienne (EAG) (Behera *et al.*, 2016; Kot *et al.*, 2018; Taher *et al.*, 2018).

Dans le groupe T4 sont retrouvées les espèces les plus pathogènes à l'origine des kératites amibiennes et d'EAG comme *A. castellanii* et *A. polyphaga* (Rayamajhee *et al.*, 2021). Les amibes libres de ce groupe ont une virulence accrue et une sensibilité réduite aux agents chimiothérapeutiques (Siddiqui and Khan, 2012).

Taxonomie de *Vermamoeba*

Initialement l'espèce *Vermamoeba vermiformis* était classée dans le genre *Hartmannella* sur la base d'observations microscopiques et était donc nommée *Hartmannella vermiformis* (Delafont *et al.*, 2018; Smirnov *et al.*, 2011). En 2011, les différences phylogénétiques, morphologiques et moléculaires ont révélé la forte appartenance de cette amibe libre aux *Echinamoeba* au sein de *Tubulinea*. *H. vermiformis* a donc été reclassée dans un nouveau genre appelé *Vermamoeba* dont l'espèce *Vermamoeba vermiformis* est l'unique représentante (Bolivar *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2011; Delafont *et al.*, 2018; Scheid *et al.*, 2019).

En effet, le corps en forme de ver, le rapport longueur/largeur supérieur à 6 et la tendance à se ramifier lors d'un changement de direction ont établi le nouveau genre, *Vermamoeba* (Smirnov *et al.*, 2011). Il existe une seule espèce dans ce genre, l'espèce *V. vermiformis*.

2.4 Morphologie

Les amibes libres existent sous deux formes : une forme trophozoïte, biologiquement active et qui permet à l'amibe de s'alimenter, de se mouvoir et de se multiplier. La forme kystique qui est une forme de résistance, de dormance et qui est biologiquement inactive. Certaines amibes possèdent également des stades intermédiaires flagellés (ex : *Naegleria fowleri*) et d'autres, forment des structures complexes qui imitent les organismes multicellulaires (ex : *Dictyostelium discoideum*) (Delafont *et al.*, 2018).

2.4.1 Les trophozoïtes

La taille des trophozoïtes se situe entre 7 μm (*Micriadermamoebida*) et 350 μm (*Amoeba proteus*) et est dépendante du genre et de l'espèce (Delafont, 2006). L'organisation structurale du trophozoïte correspond à celle d'une cellule eucaryote. Les amibes libres possèdent donc un noyau, un nucléole central, un appareil de golgi, un réticulum endoplasmique lisse et rugueux, des ribosomes, des mitochondries, des microtubules et des vacuoles (Fouque, 2013).

Les vacuoles peuvent être des vacuoles contractiles dont le rôle est de contrôler le contenu en eau de la cellule en se contractant et en expulsant l'excès d'eau en dehors de l'amibe ou encore des vacuoles alimentaires responsables de la digestion (Coulon, 2011).

Le cytoplasme des amibes libres est formé de deux parties : un ectoplasme qui est la partie externe du cytoplasme et contient essentiellement des filaments d'actines et un endoplasme qui correspond à la partie centrale du cytoplasme et qui contient le noyau et tous les organites et inclusions ainsi que des filaments de myosine. Les 2 parties du cytoplasme jouent un rôle dans le mouvement de l'amibe grâce à la formation de pseudopodes. Les pseudopodes ayant un rôle dans le mouvement mais également dans la nutrition de l'amibe en permettant la phagocytose des aliments (Fouque, 2013).

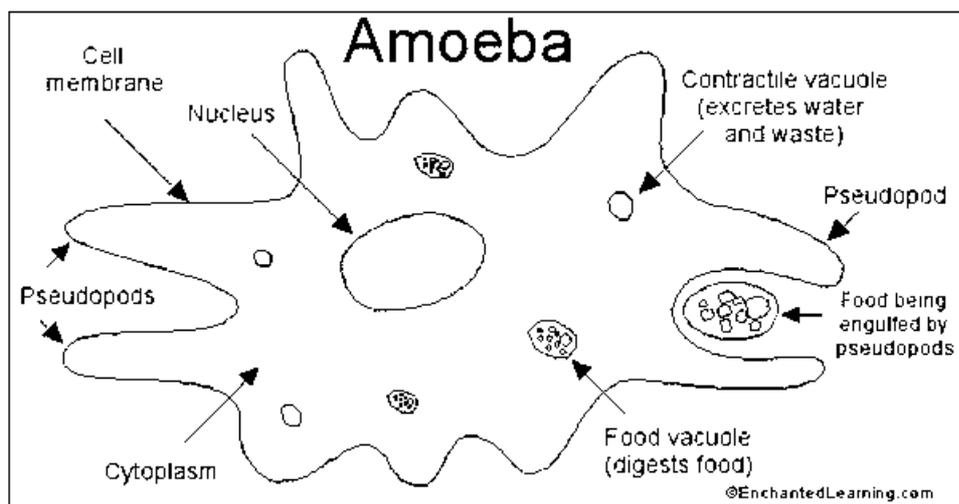


Figure 16: structure cellulaire d'une amibe libre
(<https://enchantedlearning.com/subjects/protists/amoeba.shtml>)

Genre *Acanthamoebae*

La taille des trophozoïtes est comprise entre 15 et 50 μm selon les espèces. Les amibes libres du genre *Acanthamoebae* possèdent une caractéristique commune qui est la présence de projections cytoplasmiques appelées acanthapodes. Ces acanthapodes sont fins, effilés, en forme d'épines et émergent de la surface du corps de ces amibes et sont responsables du mouvement amiboïde (Khan, 2006; Kot *et al.*, 2018; Visvesvara *et al.*, 2007). Les acanthapodes qui sont des pseudopodes permettent également l'adhésion aux surfaces et la capture des proies (Sandstrom *et al.*, 2011).

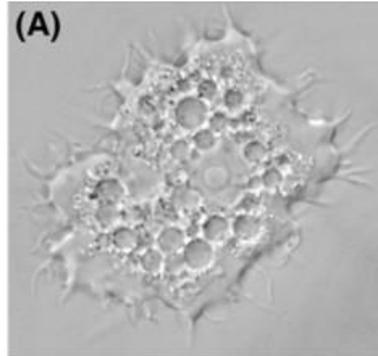


Figure 17: Trophozoïte d'*A. castellanii* (Samba-Louaka *et al.*, 2019)

Vermamoeba vermiformis

Les trophozoïtes de *Vermamoeba vermiformis* sont allongés, lisses, vermiformes et généralement plus longs que larges dont la longueur approximative est comprise entre 22 et 24 μm (Abedkhozasteh *et al.*, 2013; Delafont *et al.*, 2018; Fouque *et al.*, 2015; Scheid *et al.*, 2019)

Les cellules sont monopodiales dans la locomotion mais deviennent bi ou multipodiales quand elles changent de direction (figure 18) (Delafont *et al.*, 2018).

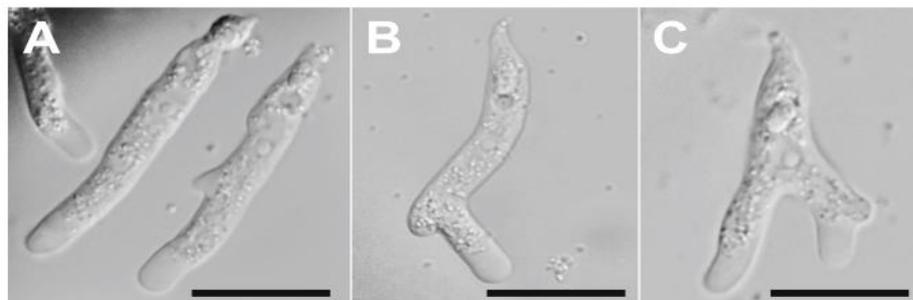


Figure 18 : Morphologie des trophozoïtes de *Vermamoeba vermiformis*. Échelle : 10 μm (Delafont *et al.*, 2018)

2.4.2 Les kystes

La forme kystique est une forme de résistance qui présente une activité métabolique réduite et qui permet aux amibes libres une meilleure résistance lorsque les conditions environnementales sont hostiles comme lorsqu'il y a un épuisement de nutriments, un stress osmotique, des changements de températures ou encore des variations de pH (Byers, 1979; Cordingley *et al.*, 1996; Delafont *et al.*, 2018; Fouque *et al.*, 2015). Les amibes libres peuvent conserver des propriétés pathogènes jusqu'à une douzaine d'années lorsqu'elles sont sous forme kystique (Khan and Tareen, 2003; Kot *et al.*, 2018; Mazur *et al.*, 1995). Les parois des kystes de certaines espèces d'amibes libres contiennent de la cellulose qui représente 10% du poids total du kyste ce qui les rend impénétrables et donc particulièrement résistants (Sandstrom *et al.*, 2011). Les kystes sont de forme sphérique à paroi simple, double ou triple et leur taille varie de 6 à 25 μm et est dépendante du genre et de l'espèce amibienne (Visvesvara *et al.*, 2007). Les trophozoïtes émergent des kystes lorsque les conditions redeviennent favorables et laissent derrière eux leur enveloppe externe (Khan, 2006). Les kystes peuvent être transportés par l'air, favorisant la propagation des amibes libres dans l'environnement (Sandstrom *et al.*, 2011).

La taille des kystes du genre *Acanthamoeba* varie de 15 à 25 μm selon les espèces. La paroi des kystes est composée d'un ectocyste et d'un endocyste (Bowers and Korn, 1969). L'endocyste peut-être de forme stellaire, polygonale, ovale ou sphérique selon les espèces (figure 19) (Kot *et al.*, 2018; Siddiqui and Khan, 2012).

A la jonction des deux couches de la paroi des kystes, sont retrouvés des pores ou ostioles recouverts d'opercules. Les ostioles servent à surveiller les changements environnementaux et permettent l'émergence des trophozoïtes à l'extérieur du kyste lors du désenkystement (Khan, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

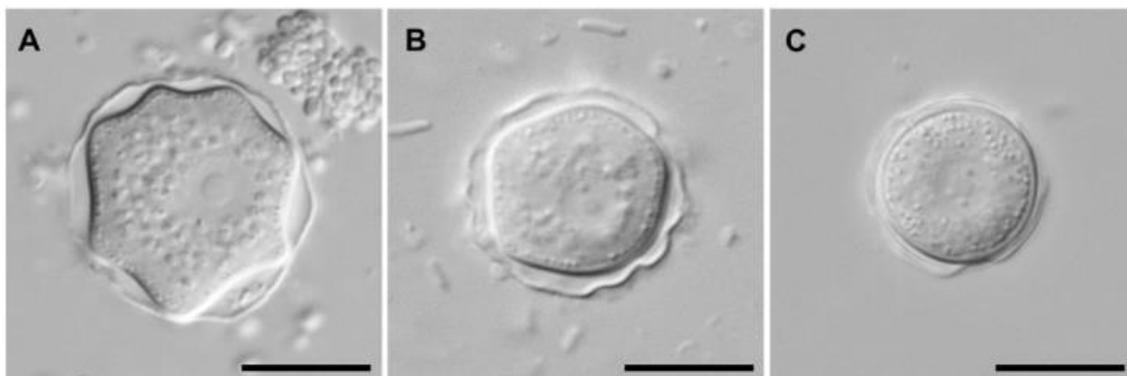


Figure 19: Kystes du genre *Acanthamoeba* en microscopie à contraste d'interférence. A : groupe I, B : groupe II et C : groupe III. Barre d'échelle 10 μm (Semaha, 2020)

Vermamoeba vermiformis se caractérise par un petit kyste de 6 à 9 µm de diamètre, rond et lisse à double paroi avec un ou deux noyaux et l'absence de cellulose et d'ostioles. (Abedkhozasteh *et al.*, 2013; Delafont *et al.*, 2018; Scheid *et al.*, 2019).

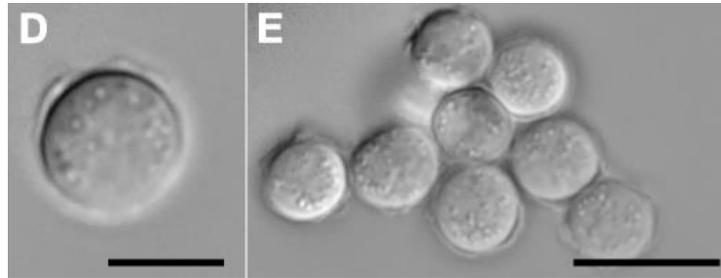


Figure 20 : kystes de *V. vermiformis* (longueur barre D: 5 µm et E: 10µm)(Delafont *et al.*, 2018)

2.5 Enkystement/ Désenkystement

2.5.1 Enkystement

Les amibes libres peuvent être maintenues sous forme trophozoïte avec un apport alimentaire suffisant (bactéries, milieu de culture), un pH neutre, une température appropriée (optimum de croissance à +30°C bien que les amibes libres peuvent survivre à des températures comprises entre +12 et +45°C), et une osmolarité comprise entre 50 et 80 mOsmol. Cependant, lorsque les conditions deviennent défavorables pour l'amibe, elle peut s'enkyster (Sandstrom *et al.*, 2011).

Les signaux induisant l'enkystement des amibes libres sont variés. Le manque de nourriture est un signal majeur pour l'enkystement des amibes libres (Bowers and Korn, 1969; Fouque *et al.*, 2012; Raizada and Murti, 1971). Le stress osmotique également (Byers, 1979; Cordingley *et al.*, 1996; Dudley *et al.*, 2005; Fouque *et al.*, 2012). Les pH et températures extrêmes ainsi que la présence de certaines bactéries comme *Francisella tularensis* ou encore *Pseudomonas aeruginosa* peuvent également induire l'enkystement (de Moraes and Alfieri, 2008; El-Etr *et al.*, 2009; Fouque *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).

Au cours de la phase d'enkystement, l'excès de nourriture, d'eau et de particules est expulsé et les trophozoïtes se condensent en une structure arrondie (prékyste) qui se transforme en un kyste à double paroi. Les niveaux cellulaires d'ARN, de protéines, de triglycérides et de glycogène diminuent considérablement pendant le processus d'enkystement, ce qui entraîne une diminution du volume cellulaire et du poids sec (Khan, 2006).

Différentes formes morphologiques ont été décrites au cours de l'enkystement. Le trophozoïte se différencie en prékyste, puis en kyste immature et enfin en kyste mature (figure 21)(Chávez-Munguía *et al.*, 2013). Pour *A. castellanii* l'enkystement se fait entre 16 et 24h, pour *V. vermiformis* l'enkystement est plus rapide et se fait en 9h (Hughes *et al.*, 2003; Neff *et al.*, 1964).

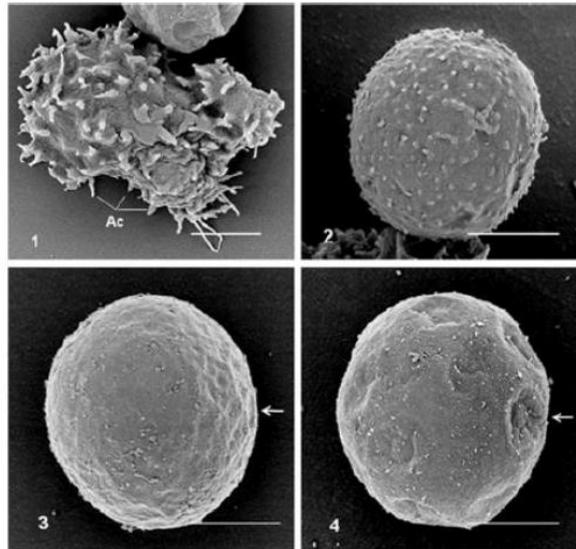


Figure 21: Observation au microscope électronique à balayage des changements morphologiques d'*A. castellanii* durant le processus d'enkystement. Les différentes photos représentent un trophozoïte (1), un prékyste (2), un kyste immature (3) et un kyste mature (4). Ac sur la première photo représente les acanthapodes et la flèche sur la photo 3 et 4 représente un ostiole. La barre de taille correspond à 5 µm (Chávez-Munguía *et al.*, 2013)

2.5.2 Désenkystement

Il a été montré que des augmentations de la concentration de dioxyde de carbone pouvait entraîner le désenkystement des amibes libres, cette augmentation en dioxyde de carbone indiquant la possible présence de bactéries et donc un environnement favorable pour leur développement (Fouque, 2013). D'autres études ont montré que la présence de bactéries induisait directement le désenkystement tout comme la présence de peptone, protéose peptone, tryptone et des fractions riches en acides aminés comme l'acide glutamique (Fouque, 2013; Kaushal and Shukla, 1977).

Il faut entre 12.5 et 36 heures à *A. castellanii* pour passer de la forme kystique à trophozoïte (Mattar and Byers, 1971). Le processus de désenkystement est constitué de plusieurs étapes, la première est une étape de pré-émergence précoce ou l'amibe qui se situe dans le kyste dit mature se détache de l'endocyste entraînant la formation d'un espace entre la cellule et la paroi avec l'apparition d'une vacuole au centre de l'amibe. Puis vient une étape de pré-émergence tardive ou le cytoplasme bourgeonne et commence à traverser la paroi kystique en passant à travers un ostiole dont l'opercule a été enlevé. Enfin, est retrouvé, l'amibe sous forme de trophozoïte et la paroi du kyste qui est vide (figure 22)(Chávez-Munguía *et al.*, 2013; Fouque, 2013; Mattar and Byers, 1971).

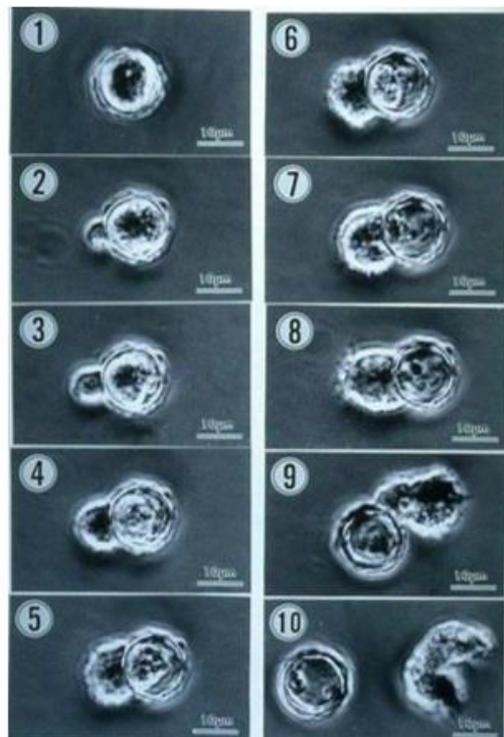


Figure 22: Étapes du désenkystement d'*Acanthamoeba culbertsoni* observées en microscopie optique (1: kyste mature; 2-4: pré-émergence; 5-9: émergence; 10: trophozoïte et kyste vide)

<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Sarcodina/acanth/03.html>

En ce qui concerne *V. vermiformis*, le désenkystement est plus rapide et dure environ 9h. Dans un premier temps, les trophozoïtes commencent à se déplacer à l'intérieur des kystes puis les trophozoïtes génèrent une ou plusieurs projections cytoplasmiques dépassant la paroi du kyste et enfin ils se libèrent de la paroi du kyste. Contrairement à *A. castellanii*, la sortie des trophozoïtes ne se fait pas par les ostioles, les kystes en étant dépourvus (figure 23) (Fouque *et al.*, 2015).

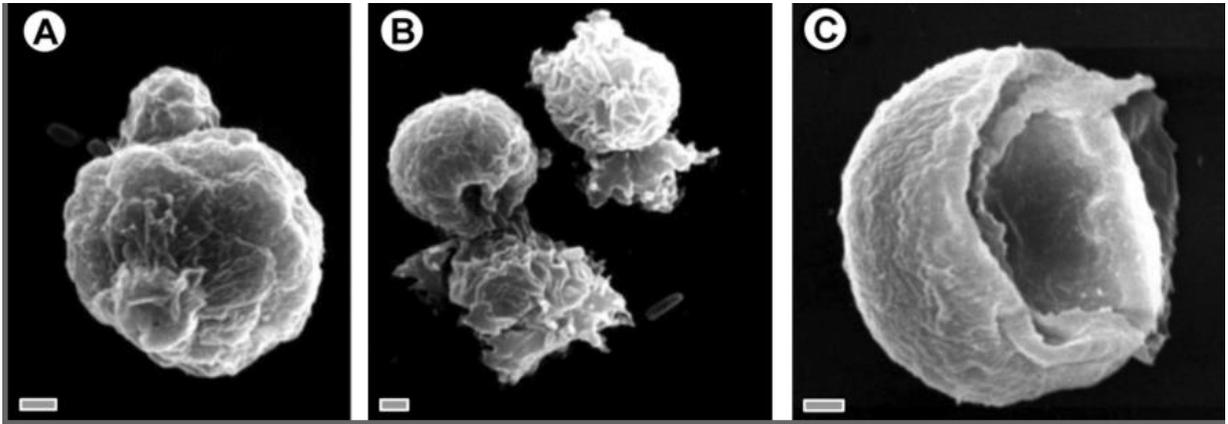


Figure 23 : Étapes de désenkystement de *Vermamoeba vermiformis* par microscopie électronique à balayage. A : kyste de *V. vermiformis* avec la présence d'une protubérance. B : émergence d'un trophozoïte. C : paroi de kyste vide. (Barre d'échelle : 1 μ m) (Fouque *et al.*, 2015)

2.6 Reproduction des amibes libres

Les amibes libres se reproduisent lorsqu'elles sont sous la forme trophozoïte et quand les conditions de croissance sont optimales (Fouque, 2013). Elles se reproduisent de façon asexuée par division binaire et le temps de génération diffère de 8 à 24h selon les différentes espèces/genotypes. Cette division permet d'obtenir deux amibes libres filles génétiquement identiques et se compose d'une étape qui s'appelle l'interphase et qui permet la réplication de l'ADN, de la mitose qui permet la division des chromosomes et la cytotéière entraînant la division du cytoplasme (Byers, 1979; Fouque, 2013).

Cependant, des gènes employés dans la méiose des eucaryotes ont récemment été identifiés dans le génome d'*Acanthamoeba* suggérant que les amibes seraient capables de se reproduire de manière sexuée (Khan and Siddiqui, 2015).

2.7 Locomotion des amibes libres

Les trophozoites ont besoin d'adhérer à un substrat pour se déplacer. Les trophozoites peuvent perdre cette adhérence et adopter une forme flottante leur permettant de se déplacer selon les courants d'eau (Delafont, 2006).

Le déplacement se fait grâce à la déformation de la membrane plasmique causée par des interactions de type actine-myosine appelées pseudopodes. Selon les genres, les amibes se déplacent grâce à un seul pseudopode comme *Vermamoeba* ou plusieurs comme *Acanthamoeba*. Le mouvement des amibes libres, dit amiboïde, est lent et caractéristique (Fouque, 2013).

Le déplacement des trophozoites est influencé par des phénomènes de chimiotactisme. Il a été suggéré que les amibes possédaient des récepteurs à certains produits bactériens comme des peptides ou encore des lipopolysaccharides (Schuster and Levandowsky, 1996).

2.8 Nutrition

2.8.1 Pinocytose

La pinocytose est un processus non spécifique qui permet d'internaliser par invagination de la membrane plasmique de grands volumes de solutés et de particules alimentaires. C'est ce mode de nutrition qui permet la culture de certaines amibes libres dans un milieu nutritif en l'absence de microorganismes (Khan, 2006).

2.8.2 Phagocytose

Dans l'environnement, la phagocytose est le principal mode de nutrition des amibes libres et est dépendante de récepteurs contrairement à la pinocytose. Les amibes libres se nourrissent principalement de bactéries mais également de levures, de micro-algues ainsi que d'autres amibes dans la mesure où l'amibe prédatrice a la capacité physique d'internaliser sa proie (Delafont, 2006; Fouque, 2013; Khan, 2006). Les amibes libres, tout au long de leur vie, ingèrent, tuent et digèrent des micro-organismes à raison d'au moins un par minute (Cosson and Soldati, 2008; Sandstrom *et al.*, 2011).

Lors du processus de phagocytose, les pseudopodes des amibes libres vont venir entourer la particule à ingérer ce qui va entraîner la formation d'une vacuole appelée phagosome. Ce processus est rapide et durerait 40 secondes (Bowers, 1977; Fouque, 2013). Le phagosome va ensuite subir une maturation puis fusionner avec un lysosome contenant les enzymes digestives et former un phagolysosome (figure 24). La digestion se fait ensuite à l'intérieur des phagolysosomes (Delafont, 2015).

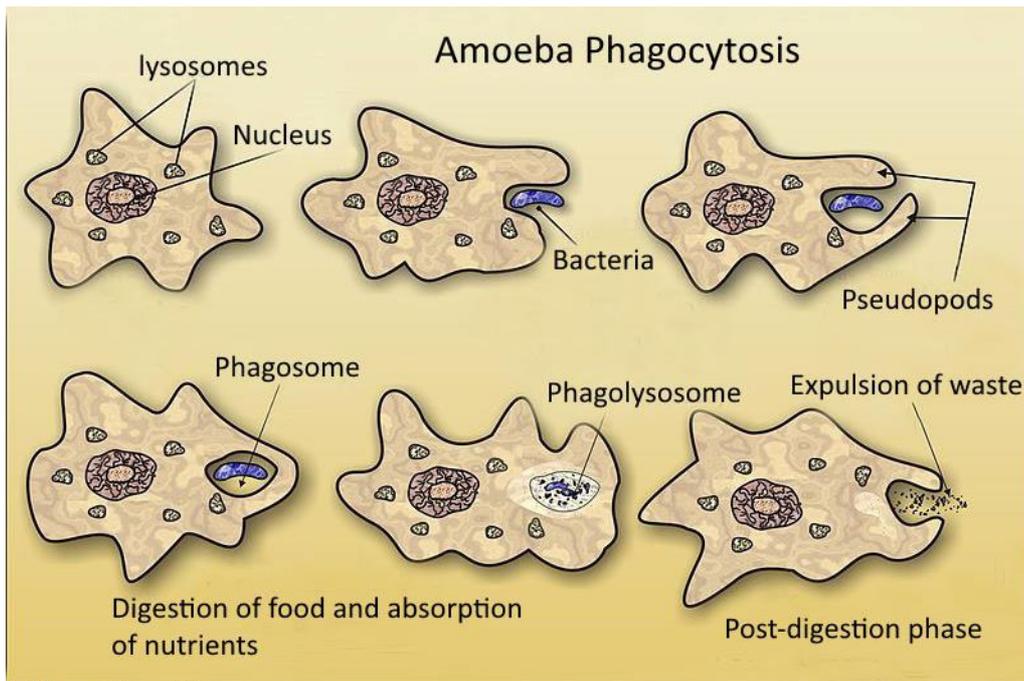


Figure 24: Représentation schématique de la phagocytose amibienne (Miklos, 2015).

Les amibes libres sont considérées comme des prédateurs de l'environnement car elles permettent de réguler la densité des populations bactériennes ainsi que leur composition. Dans les environnements extrêmes, les amibes libres ont parfois été identifiées comme prédateurs dominant la chaîne alimentaire (Delafont, 2015).

2.9 Pathogénicité directe

Les amibes libres peuvent être responsables de pathologies comme l'Encéphalite Granulomateuse Amibienne (EGA), la Méningo Encéphalite Amibienne Primitive (MEAP) ou encore la kératite amibienne qui est la pathologie la plus fréquemment retrouvée. Cependant, seules quelques amibes en sont responsables comme certaines espèces du genre *Acanthamoeba* et les espèces *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* ou encore *Sappinia dipoidea* (Cateau *et al.*, 2014).

La figure 25 présente le cycle de vie d'*Acanthamoeba* spp. La forme trophozoïte est la forme infectieuse bien que les kystes puissent également pénétrer dans l'organisme (4). L'entrée peut se faire par l'œil (5), par les voies nasales vers les voies respiratoires inférieures (6) ou par la peau ulcérée ou lésée (7). Dans l'œil, l'amibe peut provoquer une kératite (8). Lorsque la pénétration se fait par le système respiratoire ou à travers la peau, les amibes libres peuvent envahir le système nerveux central et provoquer une encéphalite amibienne granulomateuse (EAG) ou des lésions cutanées (9,10 et 11).

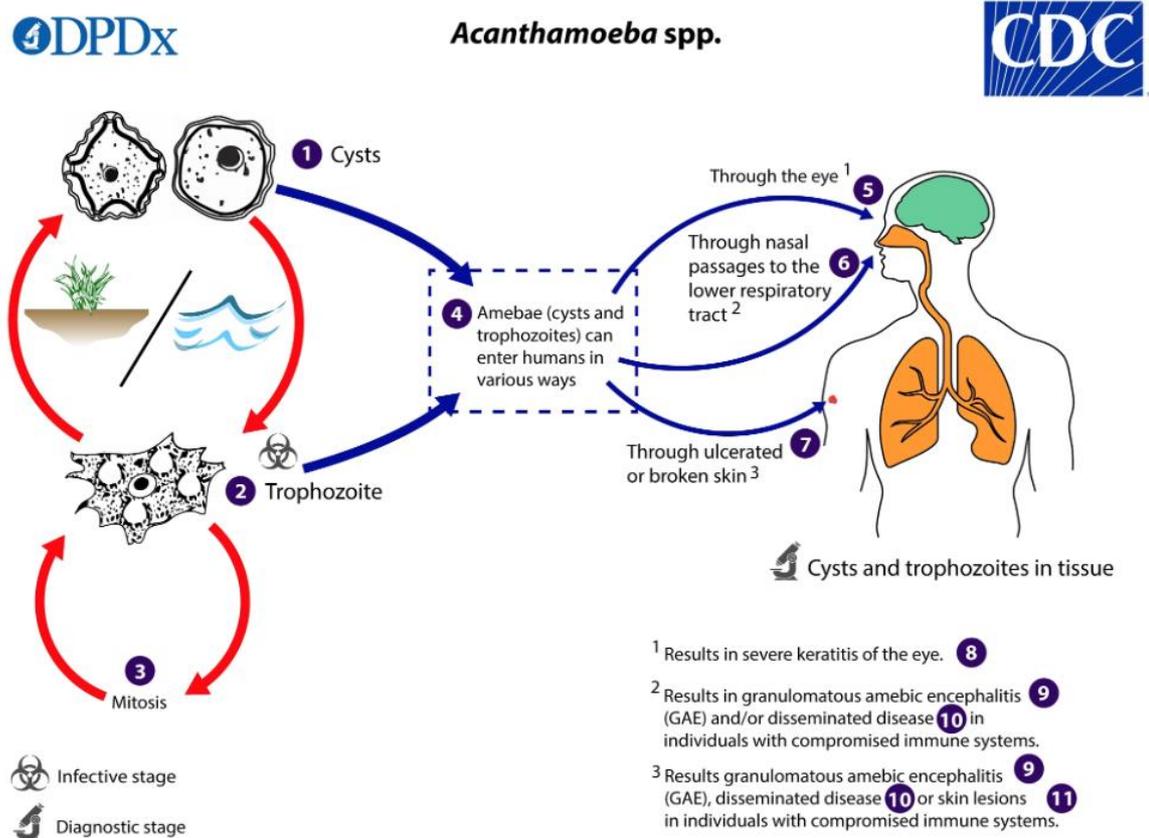


Figure 25: Cycle de vie d'*Acanthamoeba* spp. (<http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>)

V. vermiformis a été décrit comme agent étiologique à l'origine d'un ulcère douloureux adjacent à l'œil et aussi caractérisé dans le cadre d'infections mixtes : c'est à dire que *V. vermiformis* était associé à une autre amibe libre du genre *Acanthamoeba* dans le cadre d'une kératite (Delafont *et al.*, 2018; Scheid *et al.*, 2019). Sa pathogénicité est tout de même controversé, certains pensent que comme cette amibe est ubiquitaire elle peut être un simple contaminant dans les cas rapportés (De Jonckheere and Brown, 1998).

En effet, *V. vermiformis* est surtout décrit comme pathogène indirect car il est connu pour héberger de nombreux microorganismes pathogènes comme plusieurs espèces du genre *Chlamydia*, *Francisella tularensis*, mycobactéries, *Legionella pneumophila* ou encore des virus et des champignons (*Candida* spp.) (Delafont *et al.*, 2018; Scheid *et al.*, 2019).

2.9.1 Les kératites amibiennes

Les espèces amibiennes décrites comme responsables de kératite amibienne sont les suivantes : *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. culbertsoni*, *A. hatchettii*, *A. lugdunensis*, *A. quin* et *A. griffini* (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

Le 1^{er} cas de kératite amibienne a été décrit en 1973 chez une personne souffrant d'un traumatisme oculaire causé par des fragments de paille qui a utilisé l'eau du robinet pour se rincer l'œil (Clarke *et al.*, 2012; Joslin *et al.*, 2006; Kot *et al.*, 2018). Deux cas ont ensuite été signalés peu après au Royaume-Uni et pendant un certain temps, cette affection a été considérée comme une infection opportuniste rare résultant d'une blessure à l'œil (Naginton *et al.*, 1974).

Entre 1973 et 1988, 208 cas de kératite amibienne ont été signalés au CDC avec une forte augmentation de 1985 à 1988. En effet, 75% des cas sont survenus sur cette période reflétant la popularité croissante des lentilles de contact et parmi ces cas, 85% étaient des porteurs de lentilles de contact, en particulier ceux utilisant des lentilles souples (Kot *et al.*, 2018; Ren and Wu, 2010; Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara and Stehr-Green, 1990). Depuis, plusieurs épidémies de kératites amibiennes ont été décrites entraînant la mise en place par le CDC, d'une surveillance des kératites à *Acanthamoeba* depuis 2007, date d'une épidémie ayant entraîné le rappel d'une solution pour lentilles de contact aux États-Unis.

Plusieurs épidémies liées aux lentilles de contact ont été décrites liées à la résistance des amibes au produit de nettoyage de ces dernières. Cependant dans les pays en développement, des épidémies ont été rapportées dans des populations non porteuses de lentilles de contact comme dans les zones rurales du sud de l'Inde associées à un traumatisme cornéen ou une exposition à de l'eau contaminée (Lalitha *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2004).

La kératite touche les immunocompétents comme les immunodéprimés. Dans 80% elle est retrouvée chez les porteurs de lentilles de contact, les autres cas sont associés à un traumatisme oculaire de l'œil (Chang and Soong, 1991; Khan, 2006; Niederkorn et al., 1999; Sharma et al., 2000, 1990). Une mauvaise hygiène dans l'entretien des lentilles ou des étuis, liée le plus souvent à l'utilisation de l'eau du robinet non stérile est en cause dans l'apparition de la kératite amibienne. Selon une étude, 83/102 des étuis à lentilles étudiés étaient contaminés par des bactéries et 7/83 par des amibes libres. Une autre étude cas-témoins a révélé que les malades désinfectaient leurs lentilles moins souvent que ne le recommandaient les fabricants de lentilles (72% et 32%, respectivement), et étaient plus susceptibles de porter leurs lentilles pendant la baignade (63% et 30%, respectivement) (Coulon, 2011).

L'état de la cornée joue également un rôle dans l'apparition des kératites amibiennes, la présence d'abrasions de la cornée causées par le port de lentilles favorisent les infections tandis qu'il a été montré qu'une cornée intacte entraînait moins d'infections (Delafont *et al.*, 2018; Scheid *et al.*, 2019).

La forme trophozoïte est la forme pathogène qui adhère aux lentilles (Coulon, 2011). Les amibes libres adhèrent à la surface de la cornée, elles infiltrent le stroma et provoquent une réaction inflammatoire importante ainsi qu'une nécrose cellulaire et une inflammation du nerf cornéen (Clarke *et al.*, 2012; Coulon, 2011; Garner, 1993; Vemuganti *et al.*, 2004).

La kératite amibienne entraîne des douleurs oculaires sévères, une vision floue, une sensation de corps étranger, une rougeur, un œdème de la conjonctive et des paupières voir une photophobie et la formation d'ulcère cornéen en forme d'anneau avec un centre clair dans la partie centrale de la cornée associé à la disparition de kératocytes (Kot *et al.*, 2018; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; Mahgoub, 2010). Si la kératite n'est pas traitée rapidement, le pronostic visuel est engagé avec un risque de perte de l'œil (Seal, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007). L'infection se produit généralement dans un seul œil, mais des cas d'invasion bilatérale ont également été décrits (Kot *et al.*, 2018).

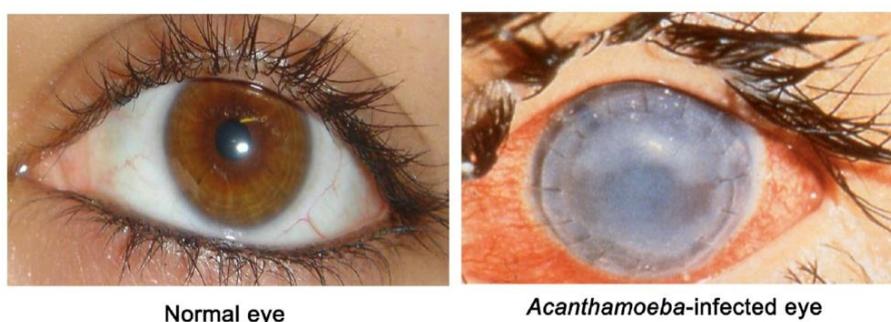


Figure 26: Oeil normal et œil infecté par *Acanthamoeba* avec de graves lésions cornéennes et une perte de vision (Siddiqui and Khan, 2012).

Le diagnostic de la kératite à amibes libres est basé sur l'examen des raclages cornéens ou du matériel prélevé lors des biopsies cornéennes ou sur leur culture à partir de tissus infectés par des méthodes de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, de microscopie confocale et d'immunofluorescence et par PCR (Clarke *et al.*, 2012; Joslin *et al.*, 2006; Kot *et al.*, 2018).

Le traitement de la kératite amibienne est difficile et de longue durée. Peuvent être utilisés, les Biguanides, la Chlorhexidine et le Voriconazole (Gueudry *et al.*, 2018). Les stéroïdes sont également utilisés pour soulager la douleur et réduire l'inflammation. Dans les cas extrêmes, l'énucléation peut être utilisée en dernier recours (Kot *et al.*, 2018; Sengor *et al.*, 2015; Trabelsi *et al.*, 2012).

2.9.2 Encéphalite amibienne granulomateuse (EAG)

Plusieurs espèces d'*Acanthamoeba*, en plus de *Balamuthia mandrillaris*, sont connues pour être à l'origine de cette pathologie: *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* et *A. divionensis* (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

L'Encéphalite amibienne granulomateuse est une maladie opportuniste. Elle est principalement retrouvée chez les patients atteints du VIH, chez les malades atteints de pathologies chroniques (diabétiques) ou encore chez les transplantés. Quelques cas ont tout de même été décrits chez des immunocompétents (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Memari *et al.*, 2017; Salameh *et al.*, 2015; Visvesvara *et al.*, 2007).

Le principal site de pénétration est l'épithélium olfactif de la cavité nasale. L'infection se fait par inhalation d'air ou par l'aspiration d'eau contaminée par les trophozoïtes (Kot *et al.*, 2018). Les trophozoïtes migrent ensuite vers le SNC par la muqueuse nasale, l'endothélium des capillaires du cerveau et l'os ethmoïde le long des nerfs olfactifs (Ahmed Khan, 2011). L'infection peut également se faire par la muqueuse buccale, la peau endommagée ou ulcérée ou encore par la cornée oculaire et la muqueuse intestinale (Visvesvara *et al.*, 2007).

L'EAG est une infection chronique du SNC, en effet l'apparition des symptômes est lente et insidieuse et se fait après quelques semaines voir quelques mois d'incubation (Kot *et al.*, 2018; Schuster and Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007).

Les symptômes sont non spécifiques et comparables à ceux d'une encéphalite virale ou bactérienne entraînant une difficulté dans le diagnostic qui se fait la plupart du temps en post-mortem. Sont retrouvés, des maux de tête, une raideur de la nuque, des nausées et vomissements, une léthargie, une ataxie cérébelleuse, des troubles visuels, une hémiparésie, des crises d'épilepsies (Kot *et al.*, 2018).

Les Hémisphère cérébraux sont les tissus les plus touchés, ils sont souvent œdémateux et une nécrose hémorragique étendue touchant les lobes temporaux, pariétaux et occipitaux est retrouvée.

En quelques semaines, le patient entre dans le coma et l'évolution est fatale dans plus de 97% des cas (Kot *et al.*, 2018; Visvesvara and Stehr-Green, 1990).

Les amibes sont peu retrouvées dans le Liquide Céphalo Rachidien (LCR), elles n'ont été isolées que dans quelques cas : chez une patient Nigérian et 2 patients atteints du SIDA (Visvesvara and Stehr-Green, 1990). Le diagnostic se fait le plus souvent lors de l'autopsie post-mortem, des trophozoites et kystes amibiens sont retrouvés dans des coupes de tissus cérébraux et le cerveau présente de multiples zones nécrotiques ou hémorragiques. Peu de traitements ont été décrits efficaces contre cette infection car dans la plupart des cas les patients sont décédés avant d'avoir été diagnostiqués (Kot *et al.*, 2018).

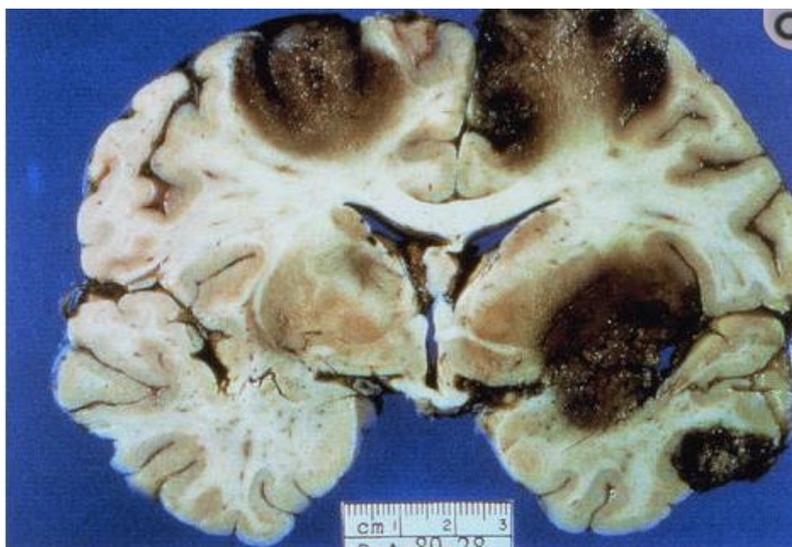


Figure 27: coupe coronale des hémisphères cérébraux avec nécrose corticale et sous-corticale d'un cas humain fatale d'AEG (Marciano-Cabral and Cabral, 2003)

L'EAG est rarissime, seulement quelques centaines de cas ont été recensés depuis 1960 au niveau mondial (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007).

2.9.3 Méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP)

L'agent responsable de cette pathologie est *Naegleria fowleri*, une amibe libre vivant librement dans les eaux douces et chaudes du monde entier (Capewell *et al.*, 2015).

La MEAP se déclare principalement chez les enfants et les jeunes adultes (l'âge médian des patients étant de 12 ans) et les patients peuvent être immunocompétents comme immunodéprimés (Capewell *et al.*, 2015; Visvesvara *et al.*, 2007).

La contamination se fait par l'inhalation de gouttelettes contenant des formes trophozoites et flagellés de *N. fowleri* lors de baignades en eaux douces et chaudes et stagnantes. Les amibes libres, une fois inhalées, pénètrent la muqueuse nasale et migrent vers le SNC par les nerfs olfactifs (Barnett *et al.*, 1996; Capewell *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 1990).

La MEAP est une maladie à évolution rapide presque toujours mortelle. La propagation des amibes libres dans le SNC provoquent un syndrome méningé fébrile avec céphalées, nausées, vomissements, un œdème et une nécrose cérébrale, coma et mort dans plus de 97% des cas (Capewell *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 1990; Visvesvara *et al.*, 2007).

Le diagnostic est difficile au vu de l'évolution rapide et se fait majoritairement après le décès comme pour l'EAG. Selon une étude aux États-Unis sur la MEAP, sur 142 cas, le diagnostic n'a été fait que chez 27% des patients avant leur décès. Les résultats d'imagerie étaient anormaux chez environ $\frac{3}{4}$ des patients mais n'ont pas permis de diagnostiquer l'infection amibienne. Un examen microscopique peut mettre en évidence la présence de trophozoites dans le LCR (Visvesvara *et al.*, 2007), la PCR peut également être utilisée pour détecter l'acide nucléique de *N. fowleri* dans le LCR (Qvarnstrom *et al.*, 2006).

La rapidité de l'infection et le peu de connaissance sur cette pathologie font qu'il existe peu de traitements. La prévention peut en être un comme éviter les baignades en eau douce et chaude (Kot *et al.*, 2018).

Cette pathologie reste cependant rare, entre 1960 et 2000, environ 200 cas ont été rapportés dans le monde (Schuster and Visvesvara, 2004). Aux États-Unis, 0 à 8 cas sont déclarés par an et entre 1973 et 2013, 142 cas ont été déclarés et seuls 3 patients ont survécu (Capewell *et al.*, 2015).

2.9.4 Autres pathologies

La plupart des cas d'acanthamoebiose cutanée rapportés à ce jour concernent des patients immunodéprimés, mais des cas chez des patients immunocompétents ont également été décrits. L'acanthamoebiose cutanée se caractérise par des nodules uniques ou multiples qui peuvent augmenter de taille et devenir ulcérés. Les lésions cutanées touchent principalement le visage, le tronc et les membres (Hadaś *et al.*, 2017; Kot *et al.*, 2018). L'acanthamoebiose cutanée, en raison d'un tableau clinique similaire, est souvent confondue avec d'autres maladies de la peau causées par des bactéries, des virus, des champignons ou des modifications inflammatoires post-traumatiques. Les erreurs fréquentes de diagnostic de la maladie entraînent une mortalité d'environ 70% (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Seal, 2003). Les lésions cutanées causées par *Acanthamoeba* peuvent évoluer vers une invasion du cerveau et des méninges des individus immunodéprimés et occasionnellement des personnes immunocompétentes provoquant un AEG (Chalmers, 2014).

Les infections causées par *Acanthamoeba* sp. peuvent également infecter les poumons, le foie, les reins, les glandes surrénales, le cœur, la peau et les os (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Seal, 2003). Il s'agit d'infections rares, qui surviennent principalement chez les patients immunodéprimés, notamment après une transplantation d'organe (Król-Turmińska and Olender, 2017).

2.9.5 Immunité

Comme les amibes libres et notamment *Acanthamoeba* spp. sont largement répandues dans l'environnement, l'exposition humaine est fréquente et les anticorps sont courants dans les sérums humains (Bottone, 1993). La prévalence des anticorps dirigés contre *Acanthamoeba* et la détection de ce micro-organisme dans les voies aériennes supérieures de personnes saines suggèrent que l'infection peut être courante avec peu de symptômes apparents chez la grande majorité des individus (Chalmers, 2014; Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Il a donc été suggéré que si les maladies oculaires graves et les infections du SNC sont rares, les infections des muqueuses par les amibes pourraient contribuer de manière significative à un grand nombre d'infections sinusiennes ou pulmonaires non diagnostiquées (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

De faibles titres d'anticorps dirigés contre *Acanthamoeba* spp. ont été observés chez 50 à 100% de personnes asymptomatiques (Bloch and Schuster, 2005). En effet, plusieurs études ont montré des niveaux variés de prévalence des anticorps dirigés contre *Acanthamoeba* dans diverses populations asymptomatiques comme la Nouvelle-Zélande (100% séropositifs) ou la République tchèque (3,2% séropositifs). Une autre étude, portant sur une population hétérogène comprenant 114 participants de 37 pays et de 6 continents différents, a montré que 87,7% des participants présentaient des anticorps (Brindley *et al.*, 2009).

Cependant, on ne sait pas si les amibes provoquent des infections transitoires chez ces individus et stimulent les mécanismes de défenses de l'hôte permettant ainsi de contrôler l'infection et de l'éliminer de l'organisme (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

2.10 Pathogénicité indirecte

2.10.1 Interactions amibes libres/bactéries et leurs implications en pathologie humaine

Initialement, les interactions bactéries-amibes libres ont été décrites dans le contexte de la relation prédateur-proie, dans laquelle les amibes libres, qui sont les prédateurs, se nourrissent de bactéries par phagocytose pour satisfaire leurs besoins nutritionnels, régulant ainsi les populations bactériennes dans l'environnement (Khan and Siddiqui, 2014; Rønn *et al.*, 2002).

Cependant, certains micro-organismes, appelés ARB (Amoeba-Resistant Bacteria), ont été décrits comme capable de résister à la phagocytose amibienne par différents mécanismes qui seront développés page 83. Les bactéries qui possèdent la capacité de résister aux amibes libres peuvent être divisées en deux groupes. Le premier groupe comprend les bactéries qui ne se reproduisent pas aux sein des amibes libres, dans ce cas, ces dernières sont considérées comme un véhicule ou un cheval de Troie et protègent ainsi les micro-organismes phagocytés des défenses innés en les aidant à franchir les barrières biologiques de l'hôte (Khan and Siddiqui, 2014). Il a été démontré une colonisation accrue des intestins de souris par *Mycobacterium avium* après son inoculation dans des amibes viables, suggérant ainsi que la capacité de *M. avium* à traverser l'épithélium intestinal était facilitée par la présence d'amibes libres.

Le deuxième groupe comprend les bactéries qui se multiplient au sein des amibes libres. les amibes libres sont alors considérées comme un réservoir biologique (Greub and Raoult, 2004; Khan and Siddiqui, 2014). La prolifération bactérienne à l'intérieur des amibes a été observée pour de nombreuses bactéries comme *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis* ou encore pour *Vibrio cholerae* (Abd *et al.*, 2003; Saeed *et al.*, 2007; Sandstrom *et al.*, 2011). En effet, les souches de *V. cholerae* co-cultivées avec des amibes peuvent croître de plusieurs logs en un jour et passer de 2×10^5 cellules/mL au jour 0 à $2,5 \times 10^9$ cellules/mL au jour 1 et à 3×10^{10} cellules/mL au jour 4 (Saeed *et al.*, 2007). Certaines bactéries utilisent donc les amibes pour se reproduire en nombre suffisant afin de produire la maladie (Khan and Siddiqui, 2014).

Depuis la découverte du rôle des amibes libres dans la transmission de bactéries, de nombreux micro-organismes dont de nombreux pathogènes pour l'Homme résistant à la phagocytose amibienne ont été décrits. En effet, un total de 102 espèces bactériennes pathogènes avérées et 27 suspectées ont été identifiées comme étant capables de survivre et/ou de se développer dans les amibes libres (Thomas *et al.*, 2010). Soit environ 20% des bactéries reconnues comme pathogènes pour l'Homme (Greub and Raoult, 2004; Thomas *et al.*, 2010). Parmi les bactéries pathogènes concernées, peuvent être citées : *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*

Dans la littérature, l'interaction amibes libres/*Legionella spp.* a été très étudiée et dès 1980, le rôle des amibes libres comme réservoir, dans la propagation et la distribution de *Legionella spp.* dans les systèmes d'eau et dans la transmission aux humains a été suggéré (Greub and Raoult, 2004). La légionellose est une infection humaine potentiellement mortelle survenant à la suite de l'inhalation d'aérosols contaminés (Fields *et al.*, 2002). Bien que les légionelles puissent survivre à l'état latent dans l'eau, elles sont incapables de se multiplier de manière extracellulaire et par conséquent, leur multiplication nécessite la présence d'amibes libres (Greub and Raoult, 2004; Murga *et al.*, 2001). Il a été démontré que la multiplication intracellulaire de *Legionella* dans les amibes est une condition préalable à l'infection des humains (Sandstrom *et al.*, 2011). Après phagocytose amibienne, il a été démontré que *L. pneumophila* présentait une motilité, une virulence et une résistance aux médicaments accrues par rapport à *L. pneumophila* cultivée de manière axénique (Greub and Raoult, 2002; Khan, 2006).

P. aeruginosa est un bacille gram négatif colonisant les systèmes d'eau (notamment des hôpitaux) qui est responsable d'un large éventail d'infections nosocomiales en particulier chez les patients immunodéprimés (Cateau *et al.*, 2014; Lyczak *et al.*, 2000). Dans certaines études, il a été montré que les amibes pouvaient phagocyter des espèces du genre *Pseudomonas* et que ces espèces pouvaient résister à la phagocytose amibienne. Plusieurs études portant sur des amibes environnementales, ont montré la présence intra amibienne de *Pseudomonas spp.* dans 26,1%, 32,6% et 59% des cas (Maschio *et al.*, 2015). Il a même été montré que dans des conditions particulières, la présence de *V. vermiformis* pouvait favoriser la croissance de *P. aeruginosa* (Cateau *et al.*, 2008; 2014). *Pseudomonas spp.* pourrait également s'avérer toxique pour les amibes libres (Greub and Raoult, 2004; Michel *et al.*, 1995).

D'autres bactéries comme les *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* ou de nouvelles espèces de *Legionella* comme *Legionella drancourtii*, sont également capables de résister à l'intérieur des amibes (Corsaro and Greub, 2006; Greub and Raoult, 2002, 2004; La Scola *et al.*, 2004). Comme ces bactéries se développent peu ou pas du tout sur les milieux de culture, elles sont soupçonnées d'être les agents responsables des pneumonies d'étiologie inconnue, qui représentent 47 à 55 % des pneumonies communautaires dans le monde chez les adultes et 20 à 75 % des pneumonies nosocomiales (Greub and Raoult, 2002; Lamoth and Greub, 2010).

Outre les bactéries, les amibes peuvent également transporter des champignons (*Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*), des protozoaires (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*) et des virus (Greub and Raoult, 2004; Hubert *et al.*, 2021; Kot *et al.*, 2018; Scheid, 2014; Scheid and Schwarzenberger, 2011; Winiecka-Krusnell *et al.*, 2009).

La proximité microbienne entre amibes libres et bactéries facilite les échanges. En effet, il a été démontré que les bactéries ont acquis des gènes de leurs hôtes amibiens (Bertelli and Greub, 2012; Shi *et al.*, 2021). En effet, l'adaptation et la coévolution entre *L. pneumophila* et les amibes libres ont façonné le génome de *L. pneumophila*, donnant lieu à un grand nombre de protéines effectrices qui jouent un rôle essentiel dans son mode de vie intracellulaire dans les macrophages humains (Best and Abu Kwaik, 2018; Shi *et al.*, 2021). Les amibes libres ont également intégré des gènes bactériens dans leurs génomes et permettent le transfert des gènes entre les bactéries intracellulaires. Cependant, seulement 41 espèces d'amibes libres ont vu leur génome séquencé et la plupart d'entre elles proviennent des genres *Dyctostelium*, *Acanthamoeba* et *Naegleria* (Mukherjee *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2021).

Lorsque les amibes libres sont enkystées, elles peuvent protéger les micro-organismes qu'elles renferment. Il a été montré que *L. pneumophila* ou encore *Shigella* internalisées dans les amibes étaient protégées de l'effet du chlore. En effet, *Shigella sonnei* est capable de survivre à l'intérieur d'amibes, augmentant sa résistance à la destruction par le chlore d'un facteur supérieur à 50 (Greub and Raoult, 2004; Kilvington and Price, 1990; King *et al.*, 1988; Sandstrom *et al.*, 2011). Similairement, une résistance accrue aux antibiotiques a été observée lorsque *M. avium* était cultivé en présence d'amibes. Cette résistance n'ayant pas été observée quand les bactéries étaient cultivées sur des monocouches cellulaires (Cirillo *et al.*, 1997; Miltner and Bermudez, 2000). Après avoir été en contact des amibes, *L. pneumophila* était 1000 fois plus résistant à la rifampicine et à la ciprofloxacine (Barker *et al.*, 1995; Khan and Siddiqui, 2014).

La résistance dans l'environnement de certaines bactéries à l'intérieur des kystes amibiens a également été documentée pour *M. avium* et *Simkania negevensis* (Kahane *et al.*, 2001; Steinert *et al.*, 1998). Après 79 jours à +4°C, l'infectiosité de *S. negevensis*, en présence d'*Acanthamoeba*, était encore supérieure à 50% de l'infectiosité initiale, alors qu'en l'absence de kystes et de trophozoïtes amibiens, la bactérie n'a pas survécu après 12 jours à +4°C (Kahane *et al.*, 2001). Il a également été montré que *V. cholerae* pouvait survivre jusqu'à deux semaines dans les amibes contrairement aux bactéries cultivées individuellement (Saeed *et al.*, 2007).

Concernant les amibes libres, la phagocytose bactérienne peut entraîner la prolifération amibienne ou l'enkystement, ou encore la mort. Par exemple, 25 % des amibes meurent lorsqu'elles sont cultivées avec *F. tularensis* (Abd *et al.*, 2003). Une étude sur l'interaction entre *A. castellanii* et *V. cholerae* a montré une prolifération de la bactérie mais également une prolifération des amibes d'un facteur 10 environ en 14 jours. L'hypothèse serait que pour infecter l'Homme il faut une grande quantité de bactéries et donc une grande quantité d'amibes dans lesquelles les bactéries peuvent se multiplier (Saeed *et al.*, 2007.; Sandstrom *et al.*, 2011).

2.10.2 Mécanismes de résistance à la prédation amibienne

Pour survivre à la phagocytose amibienne, il a été décrit chez certaines bactéries, la production d'une capsule polysaccharidique qui a un rôle protecteur contre la phagocytose amibienne mais également contre celle des macrophages humains. Cet effet protecteur contre ces deux types cellulaires a été montré chez les espèces du genre *Klebsiella* (Delafont, 2015; Domenico *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1983). En ce qui concernant *Cryptococcus neoformans*, le rôle de la capsule dans la protection des cryptocoques a été suggéré. En effet, l'élargissement de la capsule a été associé à des réductions importantes de la phagocytose par *A. castellanii*. Il a également été montré qu'en l'absence de capsules *C. neoformans* était beaucoup plus facilement ingéré par *A. castellanii* (Chrisman *et al.*, 2011). Cependant la phagocytose de *C. neoformans* survient tout de même et *C. neoformans* se multiplie à l'intérieur d'*A. castellanii*. Ceci aboutit parfois et notamment dans le cas de l'espèce amibienne *D. discoideum*, à une augmentation de la virulence de *C. neoformans* (Steenbergen *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont montré que *P. aeruginosa*, utilisait comme moyen de défense, la formation d'agrégats ou de micro-colonies entraînant une réduction du taux d'ingestion par les amibes libres (Matz *et al.*, 2004; Pickup *et al.*, 2007; Weitere *et al.*, 2005). Une autre étude a montré que *Bacillus thuringiensis*, qui est un pathogène des insectes, pouvait adopter une forme filamenteuse empêchant la phagocytose amibienne. (Delafont, 2015).

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme moléculaire par lequel les bactéries communiquent pour adapter collectivement leur comportement en fonction de la densité cellulaire et du milieu environnant. Ce système de communication permet aux bactéries, comme *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. ou encore *Acinetobacter* spp. d'entreprendre des processus utiles pour l'ensemble de la communauté à forte densité cellulaire comme la synthèse de facteurs de virulence ou encore la formation de biofilm (Rémy *et al.*, 2018). Il a été montré que les mutants de *P. aeruginosa* déficients en molécules du QS avaient une virulence réduite envers l'amibe *Disctyostelium discoideum* et qu'ils formaient moins de micro-colonies indiquant ainsi que le QS jouerait un rôle dans la résistance à la prédation amibienne (Cosson and Soldati, 2008; Pukatzki *et al.*, 2002).

Plusieurs protéines des systèmes de sécrétion sont impliquées dans la résistance à la prédation amibienne. *P. aeruginosa* utilise les protéines effectrices du système de sécrétion de type 3 pour résister à la phagocytose amibienne en détruisant *D. discoideum* et *A. castellanii* (Coburn and Frank, 1999; Pukatzki *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2003; Sandstrom *et al.*, 2011). Des études portant sur la capacité de *Mycobacterium marinum* à persister à l'intérieur des amibes libres ont montré que le système de sécrétion ESX-1 (type VII) présent chez toutes les mycobactéries virulentes était un élément clé pour l'invasion et la croissance dans les amibes libres (Cateau *et al.*, 2014; Stamm *et al.*, 2003). Il a été montré que les gènes du système de sécrétion Dot/Icm de type IV qui codent pour des protéines, sécrétées par des bactéries telles que *Legionella*, contournent la voie phagocytaire en recrutant des protéines du réticulum endoplasmique de la cellule hôte. Ce qui entraîne l'inhibition de l'adhésion aux lysosomes, la maturation des phagosomes et l'acidification des vésicules, protégeant ainsi les bactéries des attaques et permettant sa multiplication (Molmeret *et al.*, 2005; Mungroo *et al.*, 2021).

Enfin, les bactéries utilisent des mécanismes permettant leur libération dans le milieu extérieur par lyse amibienne ou encore par enrobage. La lyse amibienne est associée à la libération d'un grand nombre de bactéries et est associée à différents mécanismes plus ou moins connus. Pour *L. pneumophila*, la lyse se fait grâce à l'insertion d'un pore dans la membrane plasmique des macrophages mais aussi dans celle d'*A. polyphaga*. Il a d'ailleurs été démontré que cette bactérie provoque la lyse de toutes les cellules d'*A. polyphaga* dans les 48 heures suivant l'infection (Greub and Raoult, 2004). *L. pneumophila* peut également être libérée par exocytose de vésicules, appelées Corps Multilamellaire (CML), dans lesquels les bactéries sont enrobées (Greub and Raoult, 2004; Hubber and Roy, 2010).

Pour d'autres ARB, le mécanisme de la lyse est inconnu mais il est intéressant de noter que la lyse dépend des conditions environnementales telles que la température. En effet, il a été montré que *Parachlamydia acanthamoebae* est lytique pour *A. polyphaga* entre 32 et +37°C et endosymbiotique entre +25 et +30°C. Ceci suggère que *A. polyphaga* peut servir de réservoir pour les ARB à des températures plus basses (par exemple, lorsqu'il colonise la muqueuse nasale) et que les ARB peuvent être libérés par lyse à des températures plus élevées (par exemple, lorsque l'amibe libre atteint les voies respiratoires inférieures humaines) (Greub and Raoult, 2004).

L'espèce et la densité bactérienne semblent jouer un rôle dans la phagocytose amibienne (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Certains genres bactériens sont « comestibles », tandis que d'autres ne le sont pas et ne sont pas digérés peut-être en raison de la présence de toxines bactériennes, de pigments toxiques ou de structures de la membrane externe (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Les amibes libres ont également une préférence pour certains types bactériens. En effet, il a été montré qu'*A. castellanii* avait une plus grande affinité pour les bactéries gram négatives (Rosenberg *et al.*, 2009), comme les entérobactéries non pigmentées *E. coli* K12 et *K. aerogenes*, que pour les bactéries gram positives malgré leur abondance dans l'environnement (Khan, 2006). À faible densité, les bactéries gram négatives non comestibles, le deviennent et favorisent la croissance d'*Acanthamoeba*. Cependant à des densités élevées de bactéries par rapport aux amibes (c'est à dire > 10 pour 1), des bactéries telles que *Pseudomonas* inhibent la croissance d'*Acanthamoeba* (Shi *et al.*, 2021).

La capacité des amibes libres à phagocyter des micro-organismes dépend de l'environnement et de la virulence des bactéries. Des études ont montré qu'en l'absence de nutriments dans l'environnement, des souches virulentes d'*E. coli* K1 envahissent *Acanthamoeba* et restent viables au niveau intracellulaire. Lorsque les nutriments sont disponibles, *E. coli* K1 croit de manière exponentielle et lyse les amibes hôtes. En revanche, en l'absence de nutriments, les souches avirulentes d'*E. coli* k12 sont phagocytées par *Acanthamoeba* et sont digérées. L'interaction amibes libres/ *E. coli* dépend donc de la virulence et des conditions environnementales (Alsam *et al.*, 2006; Khan, 2006). En ce qui concerne l'interaction d'*A. castellanii* et les bactéries du genre *Shigella*, il a été montré que la croissance d'*A. castellanii* n'était pas affectée par l'absence ou la présence des espèces *Shigella* spp. Cependant à +37°C, température à laquelle les gènes de virulence de *Shigella* sp. sont activés, il a été observé une mortalité élevée d'amibes libres (Sandstrom *et al.*, 2011). La température a également un rôle important dans l'interaction *A. castellanii*/*Legionella pneumophila*. Il a été observé que cette bactérie pouvait lyser les amibes à +37°C. Cependant, à +20°C une interaction inverse se produisait et les amibes phagocytèrent et digéraient les légionnelles. (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

La capacité à phagocyter des micro-organismes et dépendante de la souche d'amibe libre

Il a été montré que certaines souches axéniques de *V. vermiformis* et d'*A. castellanii* ne pouvaient pas prédater *A. baumannii* alors que des souches sauvages des mêmes espèces ont pu le faire. Les souches de laboratoire semblent donc avoir une activité réduite car elles ont été sélectionnées pour se développer de manière axénique en se nourrissant de milieu liquide par pinocytose plutôt qu'en prédatant les bactéries par phagocytose indiquant que les amibes axéniques peuvent être partiellement défectueuses dans la prédation d'agents pathogènes (Bornier *et al.*, 2021; King and Kay, 2019).

De plus, il a été montré que la virulence des amibes pathogènes diminuait pendant la culture continue en milieu axénique mais pouvait être restaurée *in vivo*, par infection intra-nasale de souris par exemple (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Mazur and Hadaś, 1994). Il a enfin été montré que des amibes libres du genre *Acanthamoeba* perdaient leur capacité à s'enkyster de manière synchrone après une culture axénique prolongée, ce qui suggère que dans les environnements propices à leur développement, les amibes libres régulent à la baisse les gènes qui ne sont plus nécessaires à leur survie (Thomas *et al.*, 2010).

2.10.3 Relation entre les amibes libres et les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires signifiant « gros mangeurs » et constituent une défense majeure contre les microorganismes envahisseurs. Les amibes sont également des cellules phagocytaires connues pour phagocyter une grande variété de microorganismes dans le but de se nourrir (Siddiqui and Khan, 2012).

Les amibes libres partagent des caractéristiques communes avec les macrophages. Ces deux organismes possèdent la même organisation cellulaire, des similitudes physiques (figure 28), des similitudes au niveau des récepteurs de surfaces cellulaires et sont tous les deux capables de ramper et de phagocyter divers micro-organismes. Il a été montré que de nombreuses bactéries infectaient et se multipliaient, dans les macrophages et dans les amibes, de la même manière en utilisant les mêmes mécanismes aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et cellulaire (Anderson *et al.*, 2005; Siddiqui and Khan, 2012; Yan *et al.*, 2004).

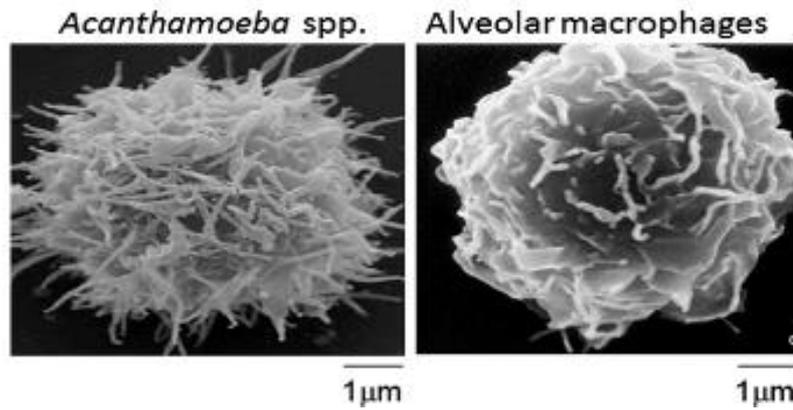


Figure 28: microscopie électronique à transmission montrant un trophozoites d'*A. castellanii* et un macrophage alvéolaire (Siddiqui and Khan, 2012)

Le cycle de vie dans les macrophages de certaines bactéries et notamment de *L. pneumophila* est très similaire à celui dans les amibes libres. Au niveau moléculaire, certaines stratégies identiques sont utilisées pour adhérer, entrer, s'échapper, se répliquer et sortir des deux types de cellules (Greub and Raoult, 2004). Il a donc été suggéré que la survie des bactéries à la digestion intracellulaire dans les amibes préadapte les bactéries à l'invasion des cellules hôtes humaines et animales (Cirillo *et al.*, 1994; Marciano-Cabral and Cabral, 2003). C'est pourquoi, dans la littérature, les amibes libres sont très fréquemment qualifiées de terrain d'entraînement pour les organismes microbiens dans le but d'échapper à la destruction par les macrophages (Salah *et al.*, 2009). Pour exemple, *M. avium* ayant été en contact avec *A. castellanii* a montré une entrée et une répllication intracellulaire accrues dans les macrophages (Cirillo *et al.*, 1997).

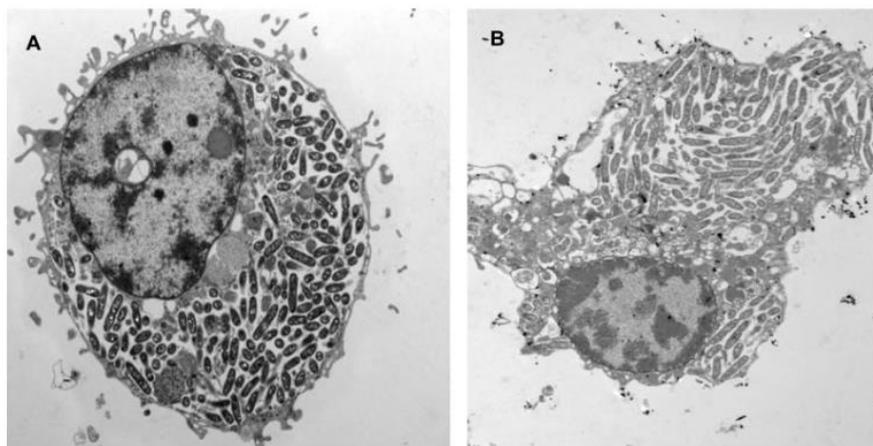


Figure 29: observation d'un macrophage (A) et d'*A. polyphaga* (B) infectés par *L. pneumophila* en microscopie électronique. (Molmeret *et al.*, 2005)

2.11 Intérêt de l'étude des amibes libres

2.11.1 Culture des amibes libres

Culture sur gélose

La culture des amibes libres peut se faire à l'aide de géloses non nutritivesensemencées avec des bactéries gram négatives qui sont en général *E. coli* ou *Enterobacter aerogenes* (Khan, 2006). Les bactéries sont utilisées comme source de nourriture pour les amibes libres. La gélose est non nutritive car elle contient très peu de nutriments inhibant ainsi la croissance des organismes indésirables. Les géloses sont ensuite incubées à +30°C. Cette méthode est largement utilisée pour l'isolement d'amibes à partir d'échantillons environnementaux et cliniques (Khan, 2006; Khan *et al.*, 2002).

Culture axénique

Les amibes libres peuvent être cultivées de manière axénique en l'absence d'organismes alimentaires vivants externes et en se nourrissant par pinocytose. Cependant les cultures d'amibes ne sont jamais vraiment axéniques car elles peuvent contenir des bactéries vivantes survivant à l'intérieur des amibes comme endosymbiontes. Pour cultiver les amibes de cette manière, l'utilisation d'un milieu PYG liquide contenant des antibiotiques est nécessaire. La culture se fait dans des flasques contenant le milieu de culture qui sont incubées à +30°C (Khan, 2006).

2.11.2 Intérêt d'utiliser les amibes libres comme modèle d'étude

L'étude de la pathogenèse dans les modèles de mammifères est compliquée par les difficultés de manipulation, les longs cycles de reproduction, la petite taille des couvées, les exigences réglementaires, le cout élevé et les considérations éthiques. Il existe donc un besoin permanent de développer des modèles simples pour étudier l'interaction entre l'agent pathogène et l'hôte comme le modèle amibien (Sandstrom *et al.*, 2011).

Bien avant que les bactéries n'interagissent avec les animaux et les humains, elles interagissaient avec les amibes libres. Les amibes libres ont évolué vers différents mécanismes pour trouver, tuer et digérer les bactéries, tandis que les bactéries ont également développé des stratégies pour résister à la prédation amibienne et, en retour, parfois pour infecter et tuer les amibes libres. La compréhension de l'évolution des interactions entre les amibes libres et bactéries permettrait de mieux comprendre le rôle des amibes dans l'origine, la propagation et le contrôle des maladies infectieuses (Shi *et al.*, 2021).

Les amibes libres sont unicellulaires et ont de fortes similitudes avec les macrophages ce qui facilite l'étude des mécanismes impliqués dans la défense de l'hôte contre les pathogènes bactériens et la découverte de nouveaux facteurs de virulence. Classiquement, l'évaluation de la virulence bactérienne chez les amibes repose sur la capacité des amibes libres à se développer ou non en présence de bactéries pathogènes ayant subi des mutations (Cosson and Soldati, 2008; Pukatzki et al., 2002; Rémy et al., 2018).

Il a été postulé que les bactéries résistantes aux amibes libres récemment découvertes sont susceptibles d'être pathogènes pour les humains et/ ou les animaux (Greub and Raoult, 2004; Molmeret et al., 2005; Thomas et al., 2010). Par conséquent, les amibes libres ont été utilisées comme outil pour isoler de nouvelles espèces d'ARB potentiellement pathogènes à partir de diverses sources (Collingro et al., 2005; Thomas et al., 2010, 2006).

La culture sélective et l'identification de nouvelles ARB peuvent se faire par co-culture amibienne ou enrichissement amibien. La co-culture amibienne consiste à utiliser des amibes comme cellules hôtes pour isoler des bactéries intracellulaires strictes à partir d'échantillons provenant directement de cas cliniques dont l'étiologie est inconnue, d'échantillons environnementaux ou par inoculation d'amibes libres suspectées d'abriter des pathogènes ou des endosymbiontes potentiels (Tosetti et al., 2014). Cette méthode consiste au dépôt d'amibes axéniques dans des microplaques qui sont ensuite inoculées par les échantillons d'intérêt. La plaque est ensuite surveillée quotidiennement au microscope afin de rechercher la présence de bactéries envahissant et lysant des amibes. Les bactéries peuvent être détectées grâce à différentes colorations (Ziehl-Neelsen, Gimenez.) ou par extraction d'ADN et identification des bactéries par une PCR 16S ou une PCR spécifique à certaines espèces suivi d'un séquençage (Jacquier et al., 2013; Tosetti et al., 2014).

L'enrichissement amibien consiste à inoculer les échantillons directement sur des plaques de gélose non nutritive (NNA) préalablement recouverte d'*E. coli* comme source de nourriture afin de cultiver les amibes libres présentes dans l'échantillon. La co-culture amibienne peut également être utilisée par la suite pour détecter des ARB. La détection des bactéries et/ou amibes se fait après extraction d'ADN et identification par PCR 18S ou 16S et séquençage (Jacquier et al., 2013; Tosetti et al., 2014).

Ces méthodes ont permis d'isoler *Legionella anisa* à partir de crachats d'un homme immunodéprimé atteint de pneumonie et pour lequel les tests de diagnostics conventionnels étaient négatifs (La Scola et al., 2004; Thomas et al., 2010). *Mycobacterium massiliense*, une nouvelle espèce de mycobactérie a été isolée à partir de l'expectoration et de liquide broncho-alvéolaire d'un patient atteint de pneumonie hémoptoïque par ensemencement sur milieu axénique et co-culture amibienne avec *A. polyphaga* (Adékambi et al., 2004).

2.12 Prévalence amibienne

Dans l'eau

Les amibes libres ont été isolées en eau douce (lacs, étangs, rivières) et en eau de mer (jusqu'à 2500 mètres de profondeur). Elles ont également été isolées dans des environnements artificiels variés comme les piscines, les bains à remous, les tours aérofrigérantes, les réseaux d'eau potables, les eaux thermales... (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Rodríguez-Zaragoza, 1994; Schuster and Visvesvara, 2004). Il a été montré que la biodiversité des genres amibiens restait similaire, quelle que soit la nature ou l'origine géographique de l'eau où les amibes étaient isolées (souterraine, de surface, domestique, systèmes de distribution d'eau potable...). Les genres amibiens les plus représentés étaient *Vermamoeba*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Echinamoeba* et *Saccamoeba* (J. F. Loret *et al.*, 2008).

Les amibes libres ont été retrouvées dans 62% des échantillons d'eaux de surface et 71% des échantillons d'eaux souterraines (J. F. Loret *et al.*, 2008).

Une prévalence plus faible, dans l'eau chaude par rapport à l'eau froide a été observée et en particulier pour des températures supérieures à +60°C (Kilvington *et al.*, 2004; Ménard-Szczebara *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2006). Dans les sources d'eaux chaudes naturelles aux États-Unis, en Amérique du sud, en Amérique du nord, en Europe, en Asie et en Afrique, *Acanthamoeba* est le genre amibien qui a été le plus isolé (48,5%) suivi par *Naegleria* (46%), *Vermamoeba* (4,7%) et *Balamuthia* (0,7%) (Fabros *et al.*, 2021).

Une étude portant sur la contamination des piscines et des bains à remous en Finlande a montré, la présence d'amibes libres dans 41% des échantillons prélevés (Vesaluoma *et al.*, 1995). Au Brésil, cette prévalence a été estimée à 20% des piscines et essentiellement au genre *Acanthamoeba* (Caumo *et al.*, 2009).

Des amibes libres ont été retrouvées dans 20 à 30 % des échantillons d'eau du robinet domestique (Shoff *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010). Les concentrations rapportées dans les systèmes domestiques pouvaient atteindre plusieurs milliers d'amibes libres par litre (Barbeau et Buhler, 2001, Ménard-Szczebara *et al.*, 2008). Au Royaume-Uni, dans une étude portant sur la colonisation des amibes libres dans les réseaux d'eau domestiques de patients souffrant de kératite, il a été montré que 89% des points d'eaux étaient contaminés (Kilvington *et al.*, 2004).

Il a été signalé que *V. vermiformis* et *Acanthamoeba polyphaga* ont été retrouvés dans 70 % des échantillons d'eau minérale en bouteille et 42 % des échantillons d'eau de source en Italie (Totaro *et al.*, 2018).

En établissement hospitalier, il existe quatre grandes catégories d'eaux: les eaux ne subissant aucun traitement (eaux à usage alimentaire et eau pour soins standards), les eaux spécifiques traitées (eau bactériologiquement maîtrisée, eau chaude, eau de piscines de rééducation, eau des bains à remous et des douches à jets, eaux pour hémodialyse, eau purifiée, eau des fontaines à usage de boisson), eaux stériles (eau pour préparation injectable, eau pour irrigation et eau potable stérilisée) et eaux techniques (Circulaire DHOS/E4/DGS/SD7A n° 2005-417 - guide technique sur l'eau dans les établissements de santé). En milieu hospitalier, l'eau peut donc servir de réservoir pour les agents pathogènes opportunistes surtout dans les services de soins prenant en charge les patients immunodéprimés, les personnes âgés, les patients de néonatalogie et de soins intensifs (Cateau *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2013). La contamination peut se faire par contact direct, par ingestion, par inhalation d'aérosols ou par transfert direct à partir de surfaces humides ou d'appareils médicaux tels que les équipements endoscopiques ou respiratoires rincés à l'eau du robinet (Cateau *et al.*, 2014; Cervia *et al.*, 2008; Decker and Palmore, 2013; Freije, 2005).

Les amibes libres ont été retrouvées en proportions variables allant de 11,5% à 68,9% dans les établissements de santé dans différentes catégories d'eaux (chambre patient (robinet, douche), fontaines à eau, piscine thérapeutique, eau de désinfection des endoscopes et bronchoscopes...) (Cateau *et al.*, 2014; Lasheras *et al.*, 2006; Ovrutsky *et al.*, 2013). L'espèce *V. vermiformis* a été rapportée comme étant prédominante dans les réseaux d'eau chaude de différents hôpitaux avec une proportion allant de 64% à 86,7% (Pagnier *et al.*, 2015; Rohr *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2010). En établissement de santé, les conditions des réseaux d'eau sont propices au développement microbien des systèmes d'eau complexes, de grande taille, avec des zones de faible débit favorisant la stagnation et la formation de biofilms, températures optimales pour la croissance bactérienne d'où l'intérêt de maîtriser la qualité microbiologique de ces eaux (Cateau *et al.*, 2014; Cervia *et al.*, 2008).

Dans le sol

Les amibes libres pourraient être les protistes les plus représentés dans le sol (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Il a été montré que les amibes libres étaient impliquées dans la stimulation du renouvellement du phosphore et de l'azote et jouaient un rôle important dans les écosystèmes du sol et dans la croissance des plantes grâce à la libération de nutriments liés à la digestion bactérienne (Bonkowski and Clarholm, 2012; Molmeret *et al.*, 2005).

Dans une étude portant sur la prévalence des amibes libres dans le sol au Cap vert, 65,4% des échantillons provenant du sable de plages, des jardins ou des sols de cultures contenait des amibes libres. *Acanthamoeba* était le genre le plus abondant et représentait 82,4% des amibes libres (Sousa-Ramos *et al.*, 2021). Des amibes libres ont été retrouvés dans les sols de forêts et de prairies mais aussi dans les sols agricoles, dans des sols miniers et alpins avec dans ces deux dernier types de sols

une prédominance des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* (55% pour les sols miniers et 77% pour les sols Alpains) (Denet *et al.*, 2017; Geisen *et al.*, 2015). La présence d'amibes libres a également été décrite dans des environnements plus extrêmes, tels que les sédiments des volcans (Coelho *et al.*, 2016).

Les amibes libres étant retrouvées dans les sols, elles ont également été isolées dans des fruits, des légumes et des plantes (Kot *et al.*, 2018; Trabelsi *et al.*, 2012). Selon une étude portant sur des champignons comestibles, 96% des champignons testés, présentaient des amibes libres sur leur surface avec comme genre prédominant *Acanthamoeba* et *Vermamoeba*. Des amibes libres ont également été retrouvées sur des laitues (52%), des radis et des oignons (Napolitano, 1982).

Facteurs influençant la présence d'amibes libres dans l'environnement

Dans l'environnement, la composition de la population amibienne dépend de paramètres physico-chimiques tels que la fluctuation annuelle de la température et les changements de pH, la présence de biofilms, les précipitations... (Kyle and Noblet, 1986; Rodríguez-Zaragoza, 1994).

Les températures élevées favorisent la présence d'amibes libres thermophiles comme l'espèce pathogène *Naegleria fowleri* (Tyndall *et al.*, 1989) ou encore *Vermamoeba vermiformis* qui a été signalée comme la principale composante des populations d'amibes libres dans les systèmes d'eau chaude (Rohr *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2006). Cependant, il n'a pas été observé de corrélation entre la température de l'eau et les concentrations en amibes libres pour des températures comprises entre +7 et +28,5 °C (J. F. Loret *et al.*, 2008).

Des changements saisonniers dans la composition des populations d'amibes libres ont été observés dans la rivière James (Virginie, USA) : les genres *Naegleria* et *Acanthamoeba* avaient une prévalence plus élevée au printemps et au début ou au milieu de l'été, alors que *Vannella*, *Vahlkampfia* et *Vermamoeba* étaient plus prévalents à la fin de l'été et en automne (Ettinger *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré qu'après des événements pluvieux, une plus grande prévalence d'amibes libres est observée dans les eaux (John and Howard, 1995; Kyle and Noblet, 1986).

Une corrélation positive significative a été trouvée entre les concentrations d'amibes libres et la matière organique dissoute dans les eaux environnementales (J. F. Loret *et al.*, 2008). Il a également été constaté que la présence de *V. vermiformis* était associée à des niveaux élevés de biomasse active et de matière organique naturelle dans les eaux souterraines (Valster *et al.*, 2009).

2.13 Résistance des amibes libres

Il a été démontré que les amibes libres d'une même espèce peuvent présenter des sensibilités différentes aux biocides (Srikanth and Berk, 1994; Thomas *et al.*, 2010). En effet, il a été constaté que les amibes isolées des eaux de tours de refroidissement étaient plus résistantes aux biocides utilisés dans ces tours que les amibes d'autres habitats. De plus, il a été montré que la pré-exposition d'un isolat ATCC environnemental de *A. hatchetti* (ne provenant pas d'une tour de refroidissement ou d'eau traitée) à des concentrations sous inhibitrices de biocides pendant 72 heures, a entraîné l'augmentation significative de la concentration minimale inhibitrice du biocide et donc la résistance des amibes libres. Une résistance croisée a également été observée, l'exposition à un biocide a provoqué la résistance des amibes libres à d'autres biocides (dont un composé thiocarbonate, le néodécanoate de tributylétain mélangé à des composés d'ammonium quaternaire, un composé d'ammonium quaternaire seul et un dérivé d'isothiazoline) (Srikanth and Berk, 1994).

Il a été montré que les kystes d'*A. castellanii* étaient entre 7 et 45 fois plus résistants que les trophozoïtes (au chlore, à la chaleur..) en revanche, il a été montré que les kystes de *V. vermiformis* étaient à peine plus résistants que les trophozoïtes et uniquement envers le chlore (Dupuy *et al.*, 2014).

2.13.1 Facteurs influençant la survie des amibes libres dans l'environnement

Températures

Les amibes libres ont une plage de températures de croissance comprises entre +12 et +45°C. Toutes les espèces pathogènes ont un optimum de croissance à +30°C et peuvent se développer à +37°C (Chalmers, 2014). À +4°C, des kystes d'*Acanthamoeba* stockés dans de l'eau ont survécu pendant 24 ans (Mazur *et al.*, 1995). La plupart des amibes libres ne résistent pas aux températures supérieures à +100°C (Coulon, 2011; Meisler *et al.*, 1985).

En cas de contamination avérée des réseaux d'eaux par des microorganismes, un choc thermique peut-être réalisé pour décontaminer les eaux. On entend par choc thermique un traitement discontinu à +70°C pendant au moins 30 min (Fouque *et al.*, 2014). Pour des températures situées entre +60 et +70 °C, les kystes d'*Acanthamoeba spp.* et *V. vermiformis* sont inactivés (tableau XV et XVI).

Tableau XV: Effet de traitements thermiques sur la survie de *Vermamoeba vermiformis*

Forme trophozoïte ou kystique de <i>V. vermiformis</i>	Température	durée	Inactivation de <i>V. vermiformis</i> en log₁₀ ou en %	références
Trophozoïtes	+50°C	30 min	> 3 log ₁₀	(Kuchta <i>et al.</i> , 1993)
Kystes			< 1 log ₁₀	(Fouque <i>et al.</i> , 2014)
			< 1 log ₁₀	(Kuchta <i>et al.</i> , 1993)
Kystes	+55°C	30 min	2,7 à 4,6 log ₁₀	(Fouque <i>et al.</i> , 2014)
Kystes et Trophozoïtes			> 3 log ₁₀	(Kuchta <i>et al.</i> , 1993)
Kystes		60 min	5.6 log ₁₀	(Fouque <i>et al.</i> , 2014)
Kystes et Trophozoïtes	+60 et +70 °C	30 min	> 4 log ₁₀	(Fouque <i>et al.</i> , 2014; Kuchta <i>et al.</i> , 1993)

Tableau XVI: Effet de traitements thermiques sur la survie d'*Acanthamoeba* spp.

Forme trophozoïte ou kystique	Température	durée	Inactivation d'<i>Acanthamoeba</i> sp. en log₁₀ ou en %	références
Trophozoïtes d' <i>A. castellanii</i>	+46°C	30 min	> 4 log ₁₀	(Turner <i>et al.</i> , 2000)
Kystes <i>Acanthamoeba</i> spp.	+55 °C	10 min	< 1 log ₁₀	(Coulon <i>et al.</i> , 2010)
Kystes d' <i>A. castellanii</i>	+55 °C	15 min	0,46 log ₁₀	(Lambrecht <i>et al.</i> , 2017)
Kystes d' <i>A. castellanii</i>	+56°C	30 min	> 4 log ₁₀	(Turner <i>et al.</i> , 2000)
Kystes d' <i>A. castellanii</i>	+60 °C	30 min	3 log ₁₀	(Cervero-Aragó <i>et al.</i> , 2014)
Kystes <i>Acanthamoeba</i> spp	+65°C	10 min	> 4,1 log ₁₀	(Coulon <i>et al.</i> , 2010)
Kystes d' <i>A. castellanii</i>	+65°C	5 min	> 4 log ₁₀	(Aksozek <i>et al.</i> , 2002)
Kystes d' <i>A. castellanii</i> et <i>A. polyphaga</i>	+80°C	10 min	> 4 log ₁₀	(Ludwig <i>et al.</i> , 1986)

Congélation

Les kystes d'*A. castellanii* se sont montrés résistants à des cycles répétés de congélation/décongélation,(5 cycles à -160°C puis à +45°C) ainsi que la cryothérapie (Aksozek et al., 2002). (Matoba *et al.*, 1989; Meisler *et al.*, 1986).

Dessiccation

Les kystes sont très résistants à la dessiccation. En effet, après un stockage de 2 à 21 ans dans un environnement complètement sec, 70% des kystes de différentes espèces du genre *Acanthamoeba* ont été réactivés et 12,5% ont survécu pendant 21 ans (Sriram *et al.*, 2008).

Eau salée

Les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* sont tués par des concentration salines > 1% bien que les kystes puissent survivre et aient été détectés dans l'eau de mer (Chalmers, 2014).

2.13.2 Effets de traitements de désinfection de l'eau sur la survie des amibes libres

Chlore

L'effet amoebicide du chlore sur *V. vermiformis* et *Acanthamoeba* spp. est présenté dans les tableaux XVII et XVIII

Tableau XVII: Effet du chlore sur *Vermamoeba vermiformis*

Forme trophozoïte ou kystique de <i>V. vermiformis</i>	Concentration en chlore	durée	Inactivation en \log_{10}	références
Kystes et Trophozoïtes	2 mg/L (2 ppm)	30 min	0,31 \log_{10}	(Kuchta <i>et al.</i> , 1993)
Trophozoïtes			> 1 \log_{10}	
Kystes	2.5 mg/L (2,5 ppm)	10, 30 et 60 min	< 1 \log_{10}	(Fouque <i>et al.</i> , 2014)
Kystes	5 mg/L (5 ppm)		0,45 à 1,7 \log_{10}	
Kystes	10 mg/L (10 ppm)	10 min	2 \log_{10} à > 4 \log_{10} selon les souches	(Fouque <i>et al.</i> , 2014)
Kystes et Trophozoïtes		30 min	4 \log_{10}	(Kuchta <i>et al.</i> , 1993)
Kystes	15mg/L (15 ppm)	10 min	> 4 \log_{10}	(Fouque <i>et al.</i> , 2014)

Tableau XVIII: Effet du chlore sur *Acanthamoeba* spp.

Forme trophozoïte ou kystique	Concentration en chlore	durée	Inactivation en log ₁₀ ou en %	références
Kystes <i>A. castellanii</i>	2 à 5 mg/L (2 à 5 ppm)	60 min	< 0,25 log ₁₀	(Cervero-Aragó <i>et al.</i> , 2014)
Kystes d' <i>A. polyphaga</i>	50mg/L (50 ppm)	18 h	résistant	(Kilvington and Price, 1990)
Kystes <i>Acanthamoeba</i> spp.	100 mg/L (100 ppm)	10 min	résistant	(Storey <i>et al.</i> , 2004)
Kyste <i>Acanthamoeba</i> spp.	2500 mg/l (2500 ppm)	30 min	2 à 6 log ₁₀	(Coulon <i>et al.</i> , 2010)

La compilation de ces résultats provenant de la littérature suggère que les kystes de *V. vermiformis* sont plus sensibles au chlore que les kystes d'*Acanthamoeba* spp.

Les concentrations résiduelles en chlore actif dans les réseaux d'eau municipaux sont < à 5 mg/L (5 ppm). À cette concentration, l'effet est minime sur les kystes de *V. vermiformis* et d'*Acanthamoeba* spp. (Kuchta *et al.*, 1993).

En cas de choc chloré, la concentration active peut varier de 15 mg/L à 100 mg/L (15 à 100 ppm) pour des expositions de 1 h à 24 h. Ce type de traitement est efficace sur *V. vermiformis* mais pas pour d'*Acanthamoeba* spp (Coulon *et al.*, 2010).

Dioxyde de chlore

Les trophozoïtes d'*A. castellanii* et d'*A. culbertsoni* exposés au dioxyde de chlore à la concentration de 3 mg/L (3 ppm) sont totalement inactivés après 30 minutes (Chalmers, 2014; Cursons *et al.*, 1980). L'effet du dioxyde du chlore sur les kystes est plus limité. En effet, il a été constaté que les kystes d'*A. polyphaga* étaient résistants au dioxyde de chlore à une concentration de 5 mg/L (5 ppm) pendant 60 minutes (Chalmers, 2014; J. F. Loret *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010).

Ozone

L'Ozone est efficace à une concentration de 0,4 à 0,5 mg/L dans l'eau sur l'inactivation des kystes d'*Acanthamoeba* spp. excepté sur *A. polyphaga* même après 2h de traitement. L'Ozone permet de diminuer considérablement le nombre de kystes dans les usines d'eau potable néanmoins l'absence d'activité résiduelle permet la croissance des amibes libres après le traitement (Coulon, 2011; Langlais and Perrine, 1986; J.-F. Loret *et al.*, 2008).

UV

Il a été montré que les UV sont relativement efficaces sur les trophozoites d'*Acanthamoeba* spp. Cependant les kystes sont très résistants aux UVs. (Hijnen *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2003). Les kystes d'*A. polyphaga* ont vu décroître leur nombre de $4\log_{10}$ après une exposition à 40 mJ.cm⁻². Une autre étude a montré qu'il fallait, pour obtenir une réduction de 2 \log_{10} , exposer les amibes à 60 J. cm⁻² (Maya *et al.*, 2003; J. F. Loret *et al.*, 2008).

L'association d'un traitement par irradiation solaire et par augmentation de la température a permis de diminuer la viabilité des kystes d'*A. polyphaga*. En effet, l'exposition des kystes d'*A. polyphaga* à une irradiation solaire simulée dans l'eau (85 mJ.s⁻¹.cm⁻²) a entraîné après 6h de traitement à +45-50°C une réduction de 1,2 et 3,6 \log_{10} d'amibes respectivement. Après 4h de traitement à +55°C, la quantité d'amibes a été réduite de 3,3 \log_{10} (Heaselgrave *et al.*, 2006).

Filtration

L'élimination physique des amibes libres par des processus de clarification et de filtration a été proposé comme un moyen efficace d'éliminer les protozoaires dans l'eau potable (J. F. Loret *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré qu'une étape de clarification par filtration sur sable éliminait environ 2 à 3 \log_{10} d'amibes libres dans l'eau et qu'une filtration successive sur charbon actif en grains éliminait 1 à 2 \log_{10} supplémentaires (Hoffmann and Michel, 2001; J. F. Loret *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010). Cependant, des rejets occasionnels d'amibes libres ont été observés à la sortie des filtres probablement dus à la colonisation des filtres pouvant altérer leur fonctionnement (J. F. Loret *et al.*, 2008). Ces résultats démontrent que malgré l'application d'une chaîne de traitement complète, les amibes libres sont toujours présentes à la sortie des lignes de traitement. (Hoffmann and Michel, 2001; J. F. Loret *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter que la majorité des espèces récupérées après filtration appartenaient aux genres *Vermamoeba* et *Echinamoeba* ce qui suggère que les kystes d'amibes libres dont le diamètre est inférieur 10 μm sont plus susceptibles de se retrouver dans l'eau potable par rapport aux kystes d'*Acanthamoeba* spp. et *Naegleria* spp qui ont un diamètre plus élevé compris entre 15 et 30 μm (Thomas *et al.*, 2010)

3 Biofilms

3.1 Généralités sur les biofilms

Les étapes de formation d'un biofilm ont été décrites à partir des bactéries mais semblent similaires à tous les micro-organismes (Samal and Das, 2018; Yadav *et al.*, 2018). Le processus de formation du biofilm s'effectue en 4 étapes : 1) l'adhésion des microorganismes aux surfaces, 2) la croissance microbienne à la surface colonisée ; 3) l'étape de maturation avec synthèse par les bactéries d'un ExoPolySaccharide (EPS) qui représente environ 90% de la biomasse du biofilm puis 4) l'étape de détachement et de dispersion permettant la colonisation d'autres surfaces (figure30) (Gebreyohannes *et al.*, 2019; Tremblay *et al.*, 2014).

Parmi les micro-organismes pathogènes formant des biofilms peuvent être cités *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Haemophilus influenza*, *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, d'autres espèces de *Streptococcus* ou encore *Candida albicans* (Gebreyohannes *et al.*, 2019)

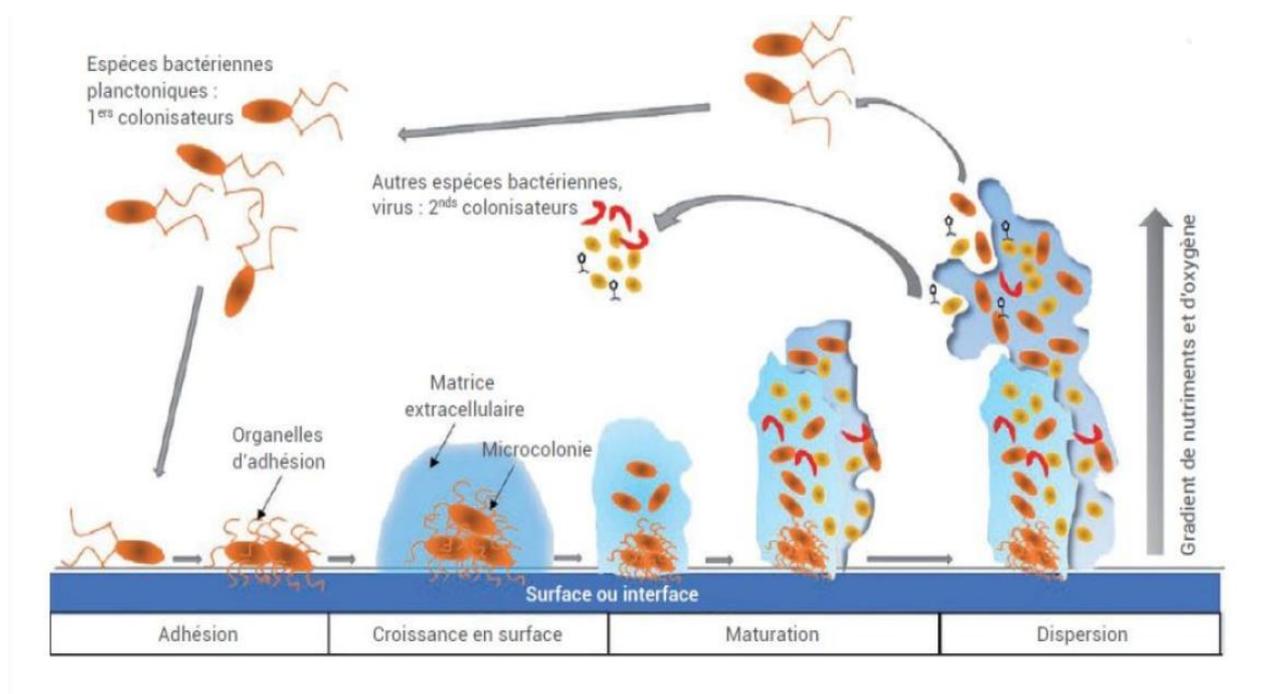


Figure 30: Schéma présentant la formation d'un biofilm bactérien

(<https://franceorganochimique.fr/wp-content/uploads/2019/06/Schéma-formation-biofilm-1024x500.jpg>)

Il a été montré que 80% de la biomasse bactérienne se présentait sous forme de biofilm, (Gebreyohannes *et al.*, 2019; Richards and Melander, 2009; Tremblay *et al.*, 2014).

Les biofilms ont des densités cellulaires élevées allant de 10^8 à 10^{11} cellules par gramme de poids humide. Ils sont fixés de manière persistante à des surfaces biotiques (dent, poumon, intestin) et abiotiques (pierre immergée dans l'eau ...) très variables. Les biofilms peuvent également coloniser les dispositifs médicaux (comme les prothèses médicales, les cathéters, les valves cardiaques et les lentilles de contact) tout comme les canalisations des systèmes de distribution des eaux (Coulon *et al.*, 2010; Gebreyohannes *et al.*, 2019; Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet, 2014).

La formation de biofilms offre une protection contre divers facteurs de stress physique et chimique comme : l'exposition aux UV (Espeland and Wetzel, 2001), la déshydratation, la salinité (Le Magrex-Debar *et al.*, 2000), le système immunitaire de l'hôte ou encore les biocides et les antibiotiques (Costerton *et al.*, 1994; Mah and O'Toole, 2001; Tremblay *et al.*, 2014; Van Houdt and Michiels, 2010).

Il a été montré que les bactéries d'un biofilm sont 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens qu'en condition planctonique (Branda *et al.*, 2005; Gebreyohannes *et al.*, 2019; Jamal *et al.*, 2018). Les facteurs principaux qui peuvent expliquer cette plus grande résistance sont : 1) la matrice EPS qui agit comme une barrière limitant la diffusion des agents antimicrobiens. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice peuvent également lier les agents anti-microbiens ; 2) Le métabolisme réduit des micro-organismes (Branda *et al.*, 2005; Costerton *et al.*, 1987; Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet, 2014; Nikolaev and Plakunov, 2007) 3) les échanges microbiens favorisés par la proximité cellulaire au sein du biofilm (transfert horizontal de gènes de résistance..) (Galloway *et al.*, 2012; Nikolaev and Plakunov, 2007).

Les biofilms constituent d'importants réservoirs environnementaux d'agents pathogènes et les organismes formant des biofilms sont à l'origine de 65 à 80 % des infections humaines (Gebreyohannes *et al.*, 2019).

3.2 Biofilm et amibes libres

Les biofilms bactériens naturels sont colonisés par un grand nombre de taxons protozoaires différents, dont des amibes libres, des flagellés et des ciliés (Arndt *et al.*, 2003 ; Weitere *et al.*, 2003 ; Parry, 2004). Il a longtemps été supposé que les biofilms constituaient un refuge contre la prédation, en particulier par des protozoaires unicellulaires, (Costerton *et al.*, 1981). Néanmoins, il a été démontré que les amibes ingéraient les bactéries même au sein des biofilms (Parry, 2004) (Heaton *et al.*, 2001 ; Weitere *et al.*, 2005). D'ailleurs, les amibes libres sous forme trophozoïtes se déplacent aisément sur les surfaces via leurs appendices locomoteurs (Pickup *et al.*, 2007; Rogerson *et al.*, 2003; Rogerson and Laybourn-Parry, 1992).

Le biofilm joue un rôle dans la prévalence des amibes libres dans l'environnement. Plusieurs publications ont souligné le fait que les biofilms constituaient le réservoir alimentaire principal des amibes libres tout en les protégeant des traitements de désinfection (monochloramine, chlore, biocides utilisés dans les tours de refroidissements) (Goudot *et al.*, 2014; Srikanth and Berk, 1994).

3.3 Biofilm et *Cryptosporidium* spp.

Une revue visant à synthétiser toutes les données actuellement disponibles sur les interactions entre les oocystes de *Cryptosporidium* et les biofilms a été réalisée au cours de cette thèse. Cette revue, présentée ci-dessous, a montré que les oocystes étaient intégrés aux biofilms et que les biofilms semblaient important dans la dissémination et la protection des oocystes dans l'environnement (Lefebvre *et al.*, 2020).



Cryptosporidium-Biofilm Interactions: a Review

M. Lefebvre,^a R. Razakandrainibe,^a I. Villena,^b L. Favennec,^{a,c}  D. Costa^{a,c}

^aLaboratory of Parasitology-Myology, EA 7510 ESCAPE, University of Rouen, Normandie, Rouen, France

^bLaboratory of Parasitology-Myology, EA 7510 ESCAPE, University of Reims Champagne-Ardenne, SFR CAP-SANTE, Reims, France

^cLaboratory of Parasitology-Myology, University Hospital of Rouen, Normandie, Rouen, France

ABSTRACT Biofilms are increasingly implicated as playing a major role in waterborne cryptosporidiosis. This review aims to synthesize all currently available data on interactions between *Cryptosporidium* oocysts and biofilms. Initially described following a waterborne outbreak, the integration of *Cryptosporidium* oocysts in biofilm has been well demonstrated. Biofilms appear important in the dissemination/protection of oocysts in the environment. Consequently, it has been suggested that substrate-associated biofilms should be systematically considered in oocyst water quality assessment. The influence of physicochemical parameters has been studied on oocyst biofilm retention. Biofilm surface roughness, ionic concentration (especially Ca²⁺), laminar/turbulent flow, shear stress, and electrostatic repulsion forces appear important to consider regarding oocyst release from biofilm. However, data analysis carried out during this review also revealed important gaps in biological interactions within biofilms, offering many perspectives for future work.

KEYWORDS biofilms, *Cryptosporidium*, waterborne pathogens

Cryptosporidium spp. are anthrozo-zoonotic parasitic protozoa belonging to the phylum Apicomplexa. The genus *Cryptosporidium* was recently classified in the subclass *Cryptogregarina* in the class of *Gregarinomorpha* (1). Cryptosporidiosis is currently classified as an emerging disease (2), and *Cryptosporidium* has been reported as the second most implicated pathogen (in both morbidity and mortality) in infants with diarrhea in developing countries (3). Several outbreaks of *Cryptosporidium* spp. have been reported. One of the main waterborne outbreaks occurred in 1993 in Milwaukee, Wisconsin, United States, where the drinking water network was contaminated, leading to more than 400,000 infections in humans and 69 deaths (4). More recently, between 2011 and 2016, at least 381 outbreaks related to protozoan waterborne transmission were described (63% due to *Cryptosporidium*). However, these outbreaks mainly occurred in New Zealand (49%) and North America (41%), while notifications from Europe represented 9% of them and there were almost none from regions of endemicity (Africa, Asia, and South America) (5). These data highlight huge variations in surveillance systems. Many parasitic outbreaks have occurred worldwide, especially in developing countries, but without any notification. An effective surveillance system requires an associated budget and clearly stated guidelines. Many differences are observed from country to country and pathogen to pathogen with a better focus on bacteria and viruses than parasites. Consequently, many protozoan parasitic waterborne outbreaks occur worldwide, but they are not reported because of a lack of parasitological investigations, diagnosis difficulties, or a lack of official declarations.

Cryptosporidium foodborne outbreaks are documented less often than waterborne ones and also are probably widely underestimated. Many reasons are given, including underreporting, lack of national/international food safety standards, and difficulties in tracing back to food items due to prolonged incubation time for cryptosporidiosis

Citation Lefebvre M, Razakandrainibe R, Villena I, Favennec L, Costa D. 2021. *Cryptosporidium*-biofilm interactions: a review. *Appl Environ Microbiol* 87:e02483-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02483-20>.

Editor Johanna Björkroth, University of Helsinki

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to D. Costa, damiencosta@chu-rouen.fr.

Accepted manuscript posted online 13 November 2020

Published 15 January 2021

(around 7 to 10 days). However, foodborne outbreaks of cryptosporidiosis are increasingly reported thanks to the development of surveillance systems such as FoodNet, National Notifiable Diseases Surveillance System, European Centre for Disease Prevention and Control, etc. *Cryptosporidium* oocysts have already been reported as responsible for outbreaks from fruits (apples, cider, etc.), vegetables (salads, spinach, etc.) dairy products, meat, and shellfish (6). Several factors could explain the frequent implication of *Cryptosporidium* in outbreaks, including (i) the low 50% infective dose (ID_{50}). ID_{50} was calculated at 132 oocysts in healthy volunteers for *Cryptosporidium parvum* (7) and was estimated between 10 and 83 oocysts for *Cryptosporidium hominis* (8) even if a single *C. hominis* oocyst could cause an infection (1, 8–10); and (ii) resistance to disinfectant. Oocysts are highly resistant to chlorine, allowing a high number to escape into wastewater treatment devices (11, 12). All considered, the impact of cryptosporidiosis on the environment is important, and special attention should be given to prevent this pathology since no real therapeutic options are available for infected humans or animals. Consequently, understanding the survival and dissemination of *Cryptosporidium* oocysts is crucial. Among potential environmental sources of contamination, the role of biofilm must be considered.

A biofilm is defined as a microbial community irreversibly associated with a surface and enclosed in an extracellular polymeric substance matrix (13). Many microbiological waterborne outbreaks, especially bacterial ones, have been linked to biofilms. For example, *Legionella* was reported as the most frequently reported etiology among drinking water-associated outbreaks, and *Legionella* replication occurs in free-living amoebae that are particularly encountered in biofilm. *Pseudomonas aeruginosa* is also frequently implicated in outbreaks due to water contamination and especially due to the development of biofilms in water distribution systems (14–16). In a recent publication, *C. hominis* was encountered in a freshwater sponge, underlining the importance of considering substrate-associated biofilms in natural aquatic environments (17). In the literature, some data are available regarding *Cryptosporidium* implicated in biofilms (mono- or polymicrobial) but without any overview. Consequently, we propose here a state-of-the-art review of current knowledge on *Cryptosporidium* spp. implicating biofilms.

Physicochemical interactions. (i) *Cryptosporidium* oocysts and biofilm attachment ability. The ability of *Cryptosporidium* oocysts to attach to biofilm was first suggested after a cryptosporidiosis waterborne outbreak that occurred in northwest England in March 2000. The outbreak control team suggested changing the water supplying the area affected by the outbreak to remove any oocyst water contamination. However, oocysts remained microscopically detectable in water for up to 19 days after the change. Authors hypothesized oocyst release from biofilm developed on the surface of distribution pipes (18). Evidence of potential *Cryptosporidium* oocyst distribution in biofilm was first provided by Skraber et al., showing the presence of oocysts in polymicrobial biofilms developed on polyvinylchloride (PVC) coupons submerged for at least 2 months in wastewater (19). Recently, Masangkay et al. compared the prevalence of oocyst detection in substrate-associated biofilms, with detection in both surface and bottom water with sediment. They observed a higher oocyst prevalence in substrate-associated biofilms and concluded that water quality assessment strategies could be strongly improved by systematically considering substrate-associated biofilms for environmental oocyst screening (20). In 2009, Wolyniak et al. reproduced biofilms in single-channel flow chambers by scraping biofilms naturally developed on rocks in creek waters. Flow chambers were previously incubated with biofilm cells for 24 h before starting a constant laminar flow. Influent water was supplemented in *C. parvum* oocysts for 3 days and was free of oocyst during several days to evaluate the sloughing of oocysts from the biofilm. Results show the ability of oocysts to integrate biofilm. Oocysts rapidly reached a steady state after inoculation and decreased to a new steady state within 5 days when oocyst supply was removed (21, 22). Oocyst biofilm integration was saturated; no increase in the number of oocysts attached to the biofilm was observed when the loading rate was increased from 10^4 to 10^5 oocysts/day (11). Helmi et al. studied oocyst attachment and detachment from two developed natural biofilms.

TABLE 1 Summary of characteristics of biofilm reported in *in vitro* models

Reactor type	Culture media	Oocyst inclusion	Strengths of the model	Weaknesses of the model	Reference no.
Flow cells	Creek water	Added to influent water after 24 h of biofilm cell incubation	Dynamic, polymicrobial, and representative of environmental conditions	Uncharacterized microorganisms, unidirectional flow, and oocysts added after biofilm development	21, 22
Flow cells	Both Jensen's and Luria-Bertani broths	Spiked after <i>P. aeruginosa</i> confluence	Dynamic model, well-characterized biofilm	Not representative of environmental conditions, monomicrobial, unidirectional flow, oocysts added after biofilm development	24
Rotating disk reactor	Both drinking water and wastewater	Spiked after 7 mo of running	Dynamic model, turbulent flow, representative of environmental conditions	Oocysts added after biofilm development, uncharacterized microorganisms	23

After 7 months of developing biofilms on polycarbonate coupons placed inside a rotating annular reactor fed with drinking water or wastewater under laminar regime, 10^6 *C. parvum* oocysts were spiked in the reactor, and oocyst biofilm attachment and detachment were monitored in time. Most attachment occurred within the first hour of biofilm exposure to oocysts. Oocysts were released from the biofilm during the entire experiment over 34 days (23). In contrast, Searcy et al. reported no significant release of oocysts from the biofilms after initial deposition. Searcy et al. developed biofilms under laminar conditions in flow cells fed with *P. aeruginosa* grown in Jensen's medium or Luria-Bertani broth. *C. parvum* oocysts were injected after obtaining confluent *P. aeruginosa* biofilms. No significant difference in the number of oocysts occurring in biofilms was observed 24 h after oocyst injection compared to 1 h or even after a 40-fold increase in flow velocity. Microbial species constituting biofilms probably strongly influence oocyst release; however, Searcy et al. did not look for oocysts released in effluent water, which could have changed their conclusions of no oocyst release from biofilms (24). The main characteristics, strengths, and weaknesses of each model are summarized in Table 1.

(ii) Biofilm thickness and oocyst attachment location. Wolyniak et al. first observed high oocyst attachment to summer biofilm cultures, which was correlated with the highest thickness of developed biofilms (22). In a subsequent complementary study, Wolyniak et al. also observed a statistically higher biofilm thickness in biofilms developed from summer sampling than winter sampling, but it was not correlated with an increase in the number of oocysts attached to the biofilm. Finally, they concluded that it was unlikely that biofilm thickness explained increased oocyst attachment because all oocysts were observed to attach at the biofilm surface, and no oocysts were ever observed within biofilm depths (21, 22).

Regarding methods, Wolyniak et al. introduced oocysts after at least 24 h of previous biofilm growth, which could at least partially explain why oocysts were always observed in superficial layers of biofilms. However, no difference in oocyst attachment location was observed if oocysts were added to the water supply during all of the experiment or only after a few days (22). In addition, Searcy et al. also always observed oocysts at the biofilm surface, introducing oocysts after obtaining a confluent *P. aeruginosa* biofilm (24). The hypothesis put forward was that the inner biofilm was denser, with less pore space, while the biofilm surface had more water channels, providing more surface area for particle attachment. Consequently, large microorganisms such as *Cryptosporidium* oocysts could more easily integrate the surface of biofilm than the deep layers (22). Searcy et al. also investigated the influence of extracellular polymeric substances on oocyst attachment to biofilm. In developing *P. aeruginosa* biofilms from both a wild-type strain and a strain overproducing exopolysaccharide (EPS) alginate, no difference in

oocyst retention was observed, suggesting no influence of EPS (24). However, such conclusions were obtained by introducing oocysts after the development of confluent biofilms from the two strains, and results could be different when introducing oocysts at the beginning of the experiment. EPS structure strongly depends on constitutive microorganisms, and further investigations considering polymicrobial communities could modify interpretations.

(iii) Biofilm roughness influence. Rather than thickness, oocyst retention appeared strongly correlated with biofilm surface roughness (11, 24). The explanation appears to be physical since a rough surface provides more surface area for attachment. Okabe et al. proved this hypothesis studying fluorescent microparticle diffusion in mixed biofilms; polymicrobial biofilms were developed on disks immersed in wastewater (or synthetic culture media) in a rotating disk reactor; tracer beads were added to young, intermediate, and mature biofilms, and tracer bead spatial distribution was measured microscopically by sectioning the biofilm. Results show that an increased surface roughness provides more surface area for bead attachment (25). Wu et al. studied the adhesion of *C. parvum* oocysts to a large number of polymeric materials. They observed an optimal adhesion of oocysts to low-surface-roughness materials (close to the surface roughness of oocysts) and suggested that, as already known for bacteria, irregularities that conform to the size of oocysts could increase the adhesion due to maximizing parasite-surface contact area (26).

(iv) Water parameter influence. Based on a preliminary study showing higher oocyst attachment from summer biofilm cultures than winter ones, Wolyniak et al. evaluated the influence of water temperature on *C. parvum* oocyst biofilm attachment (21, 22). Regarding the cumulative percentage of oocysts associated with the biofilm (grown at 5°C versus 20 to 25°C), temperature did not affect oocyst attachment. However, temperature influenced the growth of microorganisms and, consequently, the microbial biofilm composition. It has been shown that an increasing temperature results in a decreasing concentration of dissolved oxygen in water, also probably influencing microbial biofilm composition (27). The physical characteristics of the biofilm (roughness, thickness, etc.) also depend on constituting microorganisms. Consequently, temperature could indirectly influence oocyst attachment due to microorganism selection, even if such evidence needs further investigation (21). The influence of biofilm oocyst attachment was also investigated for other water parameters. Neither pH, conductivity, or dissolved organic carbon concentration appeared significantly correlated with oocyst attachment to biofilm, even if a trend of decreasing oocyst attachment with increasing pH was observed (21). Electrostatic forces have been proposed to explain, at least in part, this pH influence. *C. parvum* oocysts are neutral around pH 2 to 3 and become increasingly negatively charged as the pH increases (28). Biofilm surfaces are generally negatively charged as a result of the presence of anionic carboxyl, sulfate, and phosphoryl groups in the biofilm matrix (21, 28). Consequently, the more pH increases, the more negative repulsion forces are reinforced, probably boosting oocyst detachment. Mechanical forces probably also play a role in the observed effect of increased pH; Simoes et al. showed the facilitation of biofilm removal after sodium hydroxide exposure due to mechanical action (29). In addition, Dai et al. evaluated the effects of biofilm and natural organic matter (NOM) on the removal of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water by filtration and reported less efficient removal of oocysts from biofilm-coated bed and NOM exposure. Hypotheses were (i) pore clogging and short-circuiting of the filter bed by the biofilm; (ii) increased negative charge of oocysts due to NOM, leading to enhanced electrostatic repulsion forces; and (iii) hydrophobic interactions with oocysts (30).

(v) Ion-mediated oocyst attachment. In developing biofilms on polycarbonate coupons fed with stream water, *C. parvum* oocyst attachment appeared independent of solution ionic strength, little influenced by magnesium but strongly influenced by calcium. Luo et al. demonstrated that the attachment of oocysts to biofilms responds to a pseudo-second-order calcium-mediated process; calcium was identified as the

predominant factor that bridges the carboxylic functional groups on biofilm and oocyst surfaces to cause attachment (31). Sarkhosh et al. confirmed that oocyst binding was related to a calcium-mediated mechanism and added that it was dependent on oocyst age; the binding strength increases over a 5-week period, followed by a decrease in binding strength. Oocyst wall structure probably changes over time; the outer layer is mainly composed of glycoproteins and glucose-rich glycocalyx, whereas the inner layer is composed of glycolipids and lipoproteins. Ion-mediated interactions appeared variable over time, probably associated with oocyst wall structure modifications, but more characterization is needed (32).

(vi) Role of laminar/turbulent flow and wall shear stress. Some observations have been reported in the literature regarding the influence of flow and shear stress on oocyst detachment. First, Searcy et al. reported no release of oocysts from biofilm, even after a 40-fold increase in the laminar flow rate (2.5 ml/min). However, in their experiment, they developed a confluent *Pseudomonas aeruginosa* biofilm before oocyst loading, and finally, they observed no statistically significant detachment of *Pseudomonas* cells at the higher flow rate. They concluded that the maximum flow rate achieved in their experiment was insufficient to generate sufficient shear stress to observe microorganism release from biofilm (24). Helmi et al. observed a massive transfer of parasites from biofilm to water phase after increasing the flow rate from a laminar to turbulent regimen (23). Helmi et al. developed biofilms from drinking water and wastewater origins; biofilms were developed in a rotating annular reactor for 7 months or 14 days with a flow rate of 100 ml/min. Such variations in methods could explain differences in observed conclusions on oocyst release from biofilm. Finally, Luo et al. evaluated the impact of hydrodynamic conditions on oocyst attachment to biofilms developed in an annular rotating reactor from stream water sampling. They showed a different influence of shear stress on oocyst attachment over time; higher shear (to a certain limit) may be associated with faster initial oocyst attachment, but lower shear is associated with greater numbers of oocysts attached at equilibrium (33).

Biological interactions. (i) Biofilm oocyst replication. The development of *C. parvum* in host-cell free culture was first reported by Hijjawi et al. in 2004 and was based on microscopy (34). Based on quantitative PCR (qPCR), flow cytometry, and microscopic observations, Koh et al. reported that biofilm can support the multiplication of *Cryptosporidium* over time in an aquatic environment (35, 36). They developed *P. aeruginosa* biofilms during 24 h before continuously adding *C. parvum* oocysts into an influent medium (60 ml/h; 10^6 oocysts/24 h) for 6 days. Various *Cryptosporidium* developmental stages (sporozoites, trophozoites, type I and II meronts) were identified from the biofilm, suggesting that *Cryptosporidium* can complete much of its life cycle in a biofilm. Regarding qPCR, *C. parvum* DNA was detected targeting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. They observed a 2- to 3-fold multiplication of *C. parvum* DNA after 6 days when oocysts were exposed to biofilm versus without biofilm exposure. However, the production of new oocysts in aquatic biofilms has not been reported, and the observed *C. parvum* multiplication targeting the GAPDH gene could be discussed because the observed overexpression of the GAPDH gene could be explained by an increase in the metabolic activity of oocysts when exposed to biofilm. Finally, the ability of *Cryptosporidium* to replicate in biofilm needs further investigation.

(ii) Effect of UV on oocysts embedded in biofilm. UV irradiation on *Cryptosporidium* oocyst viability has already been reported in the literature, but biofilm influence is rarely documented (37–40). DiCesare et al. compared (i) the infectivity of oocysts attached to the top of a biofilm, (ii) the infectivity of oocysts attached to the bottom of a 30- μ m biofilm, and (iii) the infectivity of resuspended oocysts. Sun-exposed oocysts were less infectious than oocysts in the dark. The infectivity of oocysts attached to the top of the biofilm was significantly less than the infectivity of oocysts at the bottom of the biofilm, suggesting that the biofilm provides a protective barrier

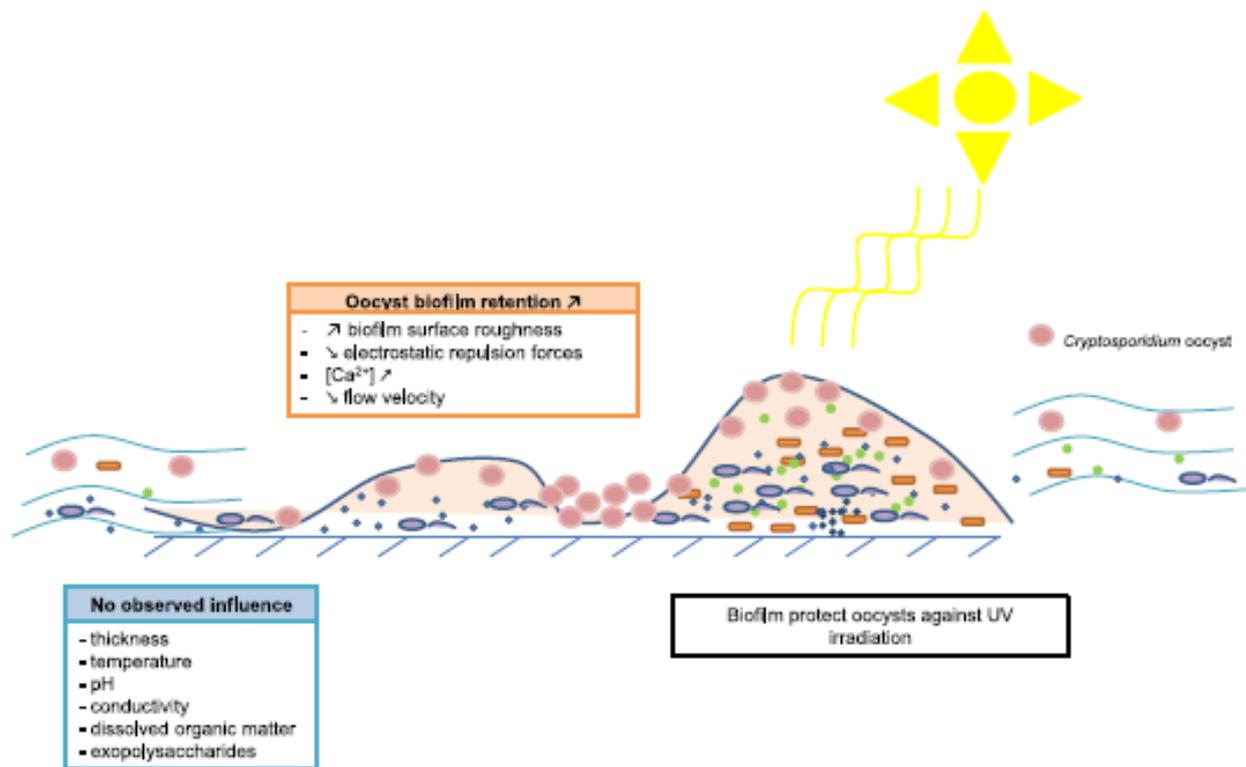


FIG 1 Schematic representation of parameters influencing oocyst retention/dissemination from biofilms.

for oocysts against solar radiation. The density of the biofilm could influence solar protection as well as the microbial community constituting the biofilm; the ability of the biofilm to absorb UV wavelengths may be a result of microbial production of sunscreen-like compounds (41).

Currently, biological investigations on oocysts embedded in biofilm are very limited. Many questions remain, especially on public health impact and outbreak prevention. How long do oocysts stay infectious in biofilm? Is oocyst release from biofilm a risk for human health? Are there any interactions with microorganisms constituting biofilms? Are natural microorganism predators, such as free-living amoebae, able to phagocytose oocysts? Are environmental disinfection methods, such as chlorine disinfection, ozone therapy etc., effective on biofilm, or should they be associated with antibiofilm strategies (flush, anti-EPS, impregnated nanoparticles, etc.)? Does mineral rock/soil composition play a role in biofilm architecture/properties? Many aspects remain to be studied.

In conclusion, the integration of *Cryptosporidium* oocysts in biofilm has been clearly demonstrated. It has also been suggested that substrate-associated biofilms should be systematically considered for environmental oocyst investigations. The release of oocysts from biofilm has also been clearly demonstrated and seems dependent on several factors (Fig. 1). Some physicochemical parameters have been studied. Among them, roughness, ion-mediated attachment (especially Ca^{2+}), and microorganisms constituting the biofilm appeared important considering oocyst integration and release from the biofilm. However, much work remains to be done, especially considering the microbial composition of biofilm and polymicrobial interactions. In addition, data analysis within the framework of this review has clearly demonstrated gaps in biological investigations between *Cryptosporidium* oocysts and biofilm integration. Consequently, future works on oocyst biofilm interactions are expected for a better understanding of the potential infectious risk for humans and its management.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

REFERENCES

1. Ryan U, Papparini A, Monis P, Hijjawi N. 2016. It's official – Cryptosporidium is a grea-greafine: what are the implications for the water industry? *Water Res* 105:305–313. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>.
2. Bamaiyi PH, Redhuan NEM. 2017. Prevalence and risk factors for cryptosporidiosis: a global, emerging, neglected zoonosis. *Asian Biomed* 10. <https://doi.org/10.5372/1905-7415.1004.493>.
3. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Orwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omoro R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegboke RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet Lond Engl* 382:209–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2).
4. Mac Kenzie WR, Schell WL, Blair KA, Adress DG, Peterson DE, Hsieh NJ, Kazmierczak JJ, Davis JP. 1995. Massive outbreak of waterborne Cryptosporidium infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis* 21:57–62. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.1.57>.
5. Efstratiou A, Ongert JE, Karanis P. 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2011–2016. *Water Res* 114:14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>.
6. Ryan U, Hijjawi N, Xiao L. 2018. Foodborne cryptosporidiosis. *Int J Parasitol* 48:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.09.004>.
7. DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med* 332:855–859. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321304>.
8. Chappell CL, Tzipori S, Akiyoshi DE, Okhuysen PC, Tanriverdi S, Langer-Curry R, Widmer G. 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 75:851–857. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.851>.
9. Benamrouz S, Guyot K, Gazzola S, Mouray A, Chassat T, Delaire B, Chabé M, Gosset P, Viscogliosi E, Dei-Cas E, Creusy C, Conseil V, Centad G. 2012. *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assessment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. *PLoS One* 7:e31232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051232>.
10. Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry RC, Akiyoshi DE, Widmer G, Tzipori S. 2011. *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *Am J Trop Med Hyg* 85:238–242. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.110-0664>.
11. Wolyniak DiCesare EA, Hargreaves BR, Jellison KL. 2012. Biofilm roughness determines *Cryptosporidium parvum* retention in environmental biofilms. *Appl Environ Microbiol* 78:4187–4193. <https://doi.org/10.1128/AEM.08026-11>.
12. Angles ML, Chandy JP, Cox PT, Fisher IH, Warnecke MR. 2007. Implications of biofilm-associated waterborne *Cryptosporidium* oocysts for the water industry. *Trends Parasitol* 23:352–356. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.06.001>.
13. Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.
14. Benedict KM, Reses H, Vigar M, Roth DM, Roberts VA, Mattioli M, Cooley LA, Hillborn ED, Wade TJ, Fullerton KE, Yoder JS, Hill VR. 2017. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water – United States, 2013–2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 66:1216–1221. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6644a3>.
15. Costa D, Bousseau A, Thevenot S, Dufour X, Laland C, Burucoa C, Castel O. 2015. Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with a drinking water fountain. *J Hosp Infect* 91:271–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.07.010>.
16. Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, Gardam MA. 2009. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:25–33. <https://doi.org/10.1086/592700>.
17. Masangkay FR, Milanez GD, Tsiami A, Somsak V, Kotepui M, Tangpong J, Karanis P. 2020. First report of *Cryptosporidium hominis* in a freshwater sponge. *Sci Total Environ* 700:134447. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134447>.
18. Howe AD, Forster S, Morton S, Marshall R, Osborn KS, Wright P, Hunter PR. 2002. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. *Emerg Infect Dis* 8:619–624. <https://doi.org/10.3201/eid0806.010271>.
19. Skrabber S, Helmi K, Willame R, Ferréol M, Gantzer C, Hoffmann L, Cauchie HM. 2007. Occurrence and persistence of bacterial and viral faecal indicators in wastewater biofilms. *Water Sci Technol* 55:377–385. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.280>.
20. Masangkay FR, Milanez GD, Tsiami A, Hapan FZ, Somsak V, Kotepui M, Tangpong J, Karanis P. 2020. Waterborne protozoan pathogens in environmental aquatic biofilms: implications for water quality assessment strategies. *Environ Pollut* 259:113903. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113903>.
21. Wolyniak EA, Hargreaves BR, Jellison KL. 2010. Seasonal retention and release of *Cryptosporidium parvum* oocysts by environmental biofilms in the laboratory. *Appl Environ Microbiol* 76:1021–1027. <https://doi.org/10.1128/AEM.01804-09>.
22. Wolyniak EA, Hargreaves BR, Jellison KL. 2009. Retention and release of *Cryptosporidium parvum* oocysts by experimental biofilms composed of a natural stream microbial community. *Appl Environ Microbiol* 75:4624–4626. <https://doi.org/10.1128/AEM.02916-08>.
23. Helmi K, Skrabber S, Gantzer C, Willame R, Hoffmann L, Cauchie H-M. 2008. Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, vaccinal poliovirus type 1, and bacteriophages X174 and MS2 with a drinking water biofilm and a wastewater biofilm. *Appl Environ Microbiol* 74:2079–2088. <https://doi.org/10.1128/AEM.02495-07>.
24. Searcy KE, Packman AI, Atwill ER, Harter T. 2006. Capture and retention of *Cryptosporidium parvum* oocysts by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 72:6242–6247. <https://doi.org/10.1128/AEM.00344-06>.
25. Okabe S, Yasuda T, Watanabe Y. 1997. Uptake and release of inert fluorescence particles by mixed population biofilms. *Biotechnol Bioeng* 53:459–469. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(199703\)53:5<459::AID-BT3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(199703)53:5<459::AID-BT3>3.0.CO;2-G).
26. Wu M, Bridle H, Bradley M. 2012. Targeting *Cryptosporidium parvum* capture. *Water Res* 46:1715–1722. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.041>.
27. Moss JA, Nocker A, Lepo JE, Snyder RA. 2006. Stability and change in estuarine biofilm bacterial community diversity. *Appl Environ Microbiol* 72:5679–5688. <https://doi.org/10.1128/AEM.02773-05>.
28. Kuznar ZA, Elimelech M. 2004. Adhesion kinetics of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts to quartz surfaces. *Environ Sci Technol* 38:6839–6845. <https://doi.org/10.1021/es0494104>.
29. Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. 2005. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res* 39:5142–5152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.028>.
30. Dai X, Hozalski RM. 2002. Effect of NOM and biofilm on the removal of *Cryptosporidium parvum* oocysts in rapid filters. *Water Res* 36:3523–3532. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00045-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00045-3).
31. Luo X, Jedlicka S, Jellison K. 2017. Pseudo-second-order calcium-mediated *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to environmental biofilms. *Appl Environ Microbiol* 83:e02339-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02339-16>.
32. Sarkhosh T, Zhang XF, Jellison KL, Jedlicka SS. 2019. Calcium-mediated biophysical binding of *Cryptosporidium parvum* oocysts to surfaces is sensitive to oocyst age. *Appl Environ Microbiol* 85:e00816-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00816-19>.
33. Luo X, Jedlicka SS, Jellison KL. 2017. Role of wall shear stress in *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to environmental biofilms. *Appl Environ Microbiol* 83:e01533-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-17>.
34. Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RCA. 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol* 34:769–777. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.04.001>.
35. Koh W, Clode PL, Monis P, Thompson R. 2013. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm

- system. *Parasit Vectors* 6:270. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-270>.
36. Koh W, Thompson A, Edwards H, Monis P, Clode PL. 2014. Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas aquatic* biofilm systems. *BMC Microbiol* 14:281. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0281-8>.
37. Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Bux F, Stenström TA. 2019. Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater. *PLoS One* 14:e0216040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216040>.
38. Bones AJ, Jossé L, More C, Miller CN, Michaelis M, Tsaoasis AD. 2019. Past and future trends of *Cryptosporidium* in vitro research. *Exp Parasitol* 196:28–37. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.001>.
39. Morita S, Namikoshi A, Hirata T, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S, Motoyama N, Fujiwara M. 2002. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 68:5387–5393. <https://doi.org/10.1128/aem.68.11.5387-5393.2002>.
40. Soliman A, El-Adawy A, Abd El-Aal AA, Elmallawany MA, Nahnoush RK, Eiaghni ARA, Negm MS, Mohsen A. 2018. Usefulness of sunlight and artificial UV radiation versus chlorine for the inactivation of *Cryptosporidium* oocysts: an in vivo animal study. *Open Access Maced J Med Sci* 6:975–981. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.180>.
41. Wolyniak DiCesare EA, Hargreaves BR, Jellison KL. 2012. Biofilms reduce solar disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 78:4522–4525. <https://doi.org/10.1128/AEM.08019-11>.

Problématique et objectifs de la thèse

Les connaissances sur la cryptosporidiose sont en constante évolution. Initialement, la cryptosporidiose était décrite exclusivement chez l'Homme immunodéprimé dans les années 1980. Aujourd'hui, elle est reconnue comme cause majeure cosmopolite de diarrhées chez les immunodéprimés mais aussi chez les immunocompétents. La cryptosporidiose est sévère chez les enfants de moins de 5 ans, en particulier dans les pays en développement. Cependant, la cryptosporidiose reste sous diagnostiquée. La détection des épidémies à *Cryptosporidium* spp. s'en trouve sous-évaluée même s'il est reconnu que la cryptosporidiose est à l'origine de nombreuses épidémies annuelles notamment hydriques liées à l'eau de baignade ou encore à l'eau de boisson. Il n'existe actuellement aucun traitement antiparasitaire pleinement efficace contre le parasite. Il y a donc un réel intérêt à essayer de limiter les contaminations en particulier d'origine hydrique. Parmi les options possibles, une maîtrise biologique du risque de contamination des ressources est envisageable.

Cryptosporidium et amibes libres sont deux micro-organismes qui partagent le même environnement hydrique et qui sont tous deux connus comme étant très résistants dans l'environnement, ils sont donc susceptibles d'interagir entre eux. De part la capacité de phagocytose amibienne, il est possible que les amibes libres puissent phagocyter les oocystes de *Cryptosporidium*, les digérer et ainsi être utilisées comme prédateur de *Cryptosporidium* spp. A l'inverse, les oocystes pourraient résister à la phagocytose amibienne, favorisant leur survie dans l'environnement.

L'objectif de cette étude a été de caractériser les interactions éventuelles entre *Cryptosporidium* et amibes libres. Pour cela, les interactions ont été évaluées dans des conditions défavorables (planctonique) ou favorables (biofilm) à la phagocytose. Enfin, une éventuelle protection aux procédures de désinfection de *Cryptosporidium parvum* par l'intermédiaire des amibes libres a été évaluée.

Matériels et méthodes

1 Souches utilisées

1.1 Les oocystes de *Cryptosporidium*

La souche de *C. parvum* utilisée a été fournie par l'Institut Nationale de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) de Nouzilly en France. Elle a initialement été isolée chez un enfant infecté et a été maintenue par infections expérimentales de veaux nouveau-nés par l'INRAE. Les oocystes de *Cryptosporidium* ne pouvant pas être cultivés, les isolats utilisés au cours de cette thèse ont donc été obtenus sur plusieurs lots successifs purifiés à partir des selles de veaux infectés par l'équipe de l'INRAE de Nouzilly. Il s'agissait d'une souche de *C. parvum* de génotype *gp60* IIaA15G2R1.

La souche de *C. hominis* utilisée était une souche clinique provenant du Centre National de Reference-Laboratoire Expert des cryptosporidioses (CNR-LE) issue d'une épidémie humaine d'origine hydrique survenue en été 2017. Il s'agissait d'une souche de *C. hominis* de génotype *gp60* IbA10G2.

Les oocystes de *Cryptosporidium* ont été purifiés par séparation immuno-magnétique (IMS) (kit Isolate® for IMMunoSeparation of *Cryptosporidium* oocysts ; TCS Biosciences, Royaume-Uni) selon les recommandations fournisseurs. L'IMS est une méthode qui permet la purification des oocystes grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium* spp. Les anticorps spécifiques étant fixés à la surface de billes magnétiques. Les billes ont été mises en contact avec la matrice contenant les oocystes à purifier puis elles ont ensuite été récupérées grâce à des aimants, puis, lavées. Les oocystes ont ensuite été libérés des billes par dissociation acide (HCl à 0,1 N ; Sigma, France) couplée à l'action mécanique d'un vortex. La suspension d'oocystes purifiés acide a ensuite été neutralisée avec de la soude (NaOH à 1N ; Sigma France). Les oocystes ont ensuite été conservés à +4°C dans une solution de PBS (PBS ; Gibco™ Thermo Fisher Scientific, France) et utilisés dans les 3 mois après purification.

1.2 Les amibes libres

Les souches de référence *A. castellanii* ATCC 30234 (American Type Culture Collection) et *V. vermiformis* ATCC 50803 ont été utilisées.

Ces souches ont été cultivées de manière axénique dans des flasques de 25cm² (Falcon®, Dutscher, France) contenant 20 mL de milieu PYG (Peptone-Yeast extract-Glucose medium). Le milieu PYG, pour un volume total d'un litre d'eau stérile, était composé de 20g de proteose peptone (BD Difco, Temse, Belgium), 1g yeast extract (BD, Difco), 0,98g de MgSO₄.7H₂O, 1g de Sodium citrate, 2H₂O, 0,02g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O, 0,34g de KH₂PO₄, 0,394g de NA₂HPO₄.7H₂O, 9g de glucose et 0,059g CaCl₂ en accord avec le protocole décrit par Coulon et al. (Coulon *et al.*, 2012).

Après 5 jours d'incubation à +28°C, les flasques ont été grattées à l'aide d'un grattoir de cellules (Nunc TM Thermo Fisher Scientific, France). Après centrifugation à 1000 g pendant 5 minutes, le culot a été lavé une fois et suspendu dans 3 mL d'eau stérile. 10 µL de la solution obtenue a été déposé sur lame Kova® (Dutscher, France) et les amibes libres ont été dénombrées en microscopie optique afin de les répartir selon les conditions des essais.

1.3 Souches bactériennes

La souche de référence, ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* a été utilisée pour la partie biofilm et une souche clinique d'*Escherichia coli* a été utilisée pour la partie Microscopie Électronique à transmission (MET). Ces souches ont été cultivées sur gélose au sang (Biorad, France) et incubées à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

1.4 Les lignées cellulaires HCT-8 et Caco-2

HCT-8

La lignée cellulaire HCT-8 utilisée dans cette étude est issue d'adénocarcinome iléocal humain (ATCC CCI-224). Cette lignée a été choisie car il a été montré qu'elle était très sensible au développement de *C. parvum* (Upton *et al.*, 1994).

Les cellules HCT-8 ont été cultivées dans des flasques ventilées de 75 cm² (Falcon®, Dutscher, France) contenant 15 mL de milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco ; Thermo Fisher Scientific, France) supplémenté avec 5% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Eurobio, France) décomplémenté, 1mM de L-glutamine, 100 UI/mL de pénicilline (CorningTM ; Thermo Fisher Scientific, France) et 100 pg/mL de streptomycine (CorningTM ; Thermo Fisher Scientific, France). Les flasques ont ensuite été incubées dans un incubateur à + 37°C avec 5% de dioxyde de carbone jusqu'à utilisation.

Après obtention de 80 à 90% de confluence, les cellules ont été utilisées pour les essais ou repiquées. Pour cela, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées au PBS puis 2 mL de trypsine-EDTA (0,05% ; Gibco ; Thermo Fisher Scientific, France) ont été ajoutés dans la flasque. La flasque a ensuite été incubée pendant 10 minutes à + 37°C afin de détacher complètement le tapis cellulaire. La trypsine permet de dégrader le système protéique de fixation des cellules aboutissant à leur séparation et à leur détachement du support de culture. Afin d'arrêter l'effet de la trypsine, après 10 minutes, 8 mL de milieu de culture a été ajouté à la flasque. Le contenu de la flasque a été transféré dans un tube Falcon de 15 mL qui a été centrifugé ensuite à 800 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot a été suspendu dans du milieu de culture et la suspension obtenue a permis l'inoculation de trois nouvelles flasques ou a directement été inoculée dans des plaques de cultures.

Les cellules HCT-8 ont été conservées dans une solution composée de 90% de SVF décomplémenté et de 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO ; Corning™ ; Thermo Fisher Scientific, France) à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 est issue de cellules d'adénocarcinome colorectal humain (ATCC HTB-37). Bien qu'il ait été montré que le modèle HCT-8 était un meilleur modèle que le modèle Caco-2, il a tout de même été montré que *Cryptosporidium* pouvait se développer sur ce dernier (Yu *et al.*, 2000). Les cellules Caco-2 ont été cultivées, conservées et utilisées de la même manière que les cellules HCT-8, seul le milieu de culture était différent. En effet les cellules Caco-2 ont été cultivées sur du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Gibco™, France) supplémenté avec 5% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Eurobio, France) décomplémenté et 100 UI/mL de pénicilline (Corning™ ; Thermo Fisher Scientific, France) et 100 pg/mL de streptomycine (Corning™ ; Thermo Fisher Scientific, France).

2 Étude des interactions entre amibes libres et *C. parvum* ou *C. hominis* en planctonique et en biofilm.

2.1 En planctonique

Les souches d'*A. castellanii*, *V. vermiformis* et *C. parvum* ou *C. hominis* ont été co-incubés en eau stérile à +4 °C pendant 7 (*C. hominis*) à 28 jours (*C. parvum*). La MOI (Multiplicity Of Infection) était de 1 à la concentration de 2 x10⁶ cellules/mL (v/v) pour *C. parvum* et 10⁵ cellules/mL (v/v) pour *C. hominis*. Après 0, 3, 7, 14, 21 et 28 jours pour *C. parvum* et 0, 1, 3, 24, 72 heures (3 jours) et 168 heures (7 jours) de temps de contact, les interactions entre amibes libres et *Cryptosporidium* ont été étudiées: i) microscopiquement sur cellules de Kova® par dénombrement des amibes libres et évaluation de leur survie après coloration vitale au bleu de trypan 0,4% ii) microscopiquement sur cellules de Kova® par dénombrement des oocystes de *C. parvum* et iii) par l'évaluation de l'infectiosité des oocystes par qPCR associée à de la culture cellulaire. Ces méthodes sont décrites dans les parties suivantes. Le nombre de réplicats indépendants (N) était égal à 3 pour l'étude avec *C. parvum* et était égal à 2 pour l'étude avec *C. hominis* en rapport avec la quantité limitée disponible d'oocystes de *C. parvum* mais surtout de *C. hominis*

2.2 En biofilm

Les biofilms ont été formés en plaques 24 puits (Thermo Fisher Scientific, France). Pour cela, une suspension bactérienne de *P. aeruginosa* de DO 0,5 Mac Farland a été inoculée dans chacun des puits. Après 24 heures d'incubation à température ambiante, le surnageant a été retiré et chaque puits a été lavé trois fois avec de l'eau stérile. La présence d'un biofilm à *P. aeruginosa* a été confirmée par microscopie inversée pour chaque puits.

Une suspension d'amibes libres et/ou d'oocystes de *C. parvum* a été inoculée dans les puits contenant le biofilm à la concentration de 5×10^5 cellules/puits pour *C. parvum* et $3,5 \times 10^4$ cellules/puits pour *C. hominis*. Les plaques ont ensuite été incubées à température ambiante pendant une durée maximale de 7 jours. La cinétique d'étude était de 0, 1, 3, 24, 72 et 168 heures d'incubation. Pour chaque point de cinétique, les puits ont été rincés trois fois avec de l'eau stérile et le biofilm a été gratté dans 500 μ l d'eau stérile et transféré dans un tube eppendorf de 1,5 mL (eppendorf™, Thermo Fisher Scientific, France). Les interactions entre amibes et oocystes ont été évaluées comme décrit dans la partie planctonique et les résultats ont été exprimés en quantité de micro-organismes. Le nombre de réplicats indépendants (N) était égal à 3 pour l'étude avec *C. parvum* et était égal à 2 pour l'étude avec *C. hominis*.

2.3 Dénombrement des oocystes

Les oocystes ont été dénombrés sur lame Kova ®. Cette lame permettant de réaliser une numération à l'aide d'une grille de comptage en microscopie optique (grossissement x 400 ; Olympus CH30, France).

2.4 Évaluation de la survie des amibes libres

La viabilité des amibes libres a été évaluée à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan 0,4% (v/v) (Gibco ; Thermo Fisher Scientific, France). Le test d'exclusion de colorant s'appuie sur le fait que les cellules viables n'absorbent pas les colorants comme le bleu de trypan car elles sont imperméables alors que les cellules mortes sont perméables et absorbent le colorant.

Les cellules mortes et vivantes ainsi que les formes kystiques ont été dénombrées par microscopie sur lame Kova (grossissement x 200 ; Olympus CH30, France). Les résultats concernant l'évaluation de la survie des amibes libres sont exprimés en concentration d'amibes libres en fonction du temps. Les résultats prennent en compte les amibes libres vivantes que ce soit sous forme trophozoïte ou sous forme kystique.

2.5 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* et de *C. hominis*

L'évaluation de l'infectiosité du parasite a été réalisée par infection de cultures cellulaires suivie de la détection de l'ADN parasitaire par PCR en temps réel (CC-qPCR) d'après Kubina et al (Kubina *et al.*, 2021). Cette méthode est basée sur la capacité du parasite, sous forme d'oocystes purifiés ou dékystés, à accomplir son cycle de développement et se multiplier au sein des cellules HCT-8 ou encore Caco-2. La multiplication parasitaire étant mise en évidence par la détection de l'ADN du parasite au sein des cellules par qPCR.

La première étape a été de cultiver les cellules HCT-8 dans des plaques 24 puits à la concentration de 2×10^4 cellules/ puits dans du milieu RPMI contenant 10% de SVF et des antibiotiques comme décrit précédemment. Les cellules ont été cultivées en monocouche à + 37°C sous 5% de dioxyde de carbone jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 90%.

Lorsque les cellules étaient confluentes, elles ont directement été infectées avec un milieu dit de co-culture contenant les oocystes de *C. parvum*. Pour *C. hominis*, contrairement à *C. parvum*, une étape de dékystement des oocystes avec de l'acide taurocholique 1,5% avant infection des cellules HCT-8 a été nécessaire. Le milieu de co-culture était composé de RPMI 1640 supplémenté avec 45 mg/mL de glucose (Sigma, France), 40 µg/mL d'acide para-aminobenzoïque (Sigma, France), 1 UI/mL d'insuline (Sigma, France), 100 UI/mL de pénicilline, 100 pg/mL de streptomycine et 10% de SVF (Upton *et al.*, 1994). La suspension parasitaire était déposée sur le tapis cellulaire à la concentration de 10^3 oocystes/puits ainsi que dans des puits sans cellules HCT-8 à la même concentration. Les plaques étaient ensuite incubées à +37°C sous 5% de dioxyde de carbone.

Après 48 heures d'incubation, l'ADN de *Cryptosporidium parvum* ou *hominis* a été extrait et purifié à l'aide du QIAamp DNA mini kit (Qiagen, France) selon les instructions du fournisseur.

L'ADN a ensuite été quantifié par qPCR en plaques 96 puits (Biorad, France) grâce à un thermocycleur CFX96™ (Biorad, France). Dans les puits, ont été ajoutés 25 µL de suspension contenant 5 µL d'ADN, 12,5 µL d'iQ™ Supermix (Biorad, France), 1 µL de chaque amorce à 10 µM (forward, 5'-CGCTTCTCTAGCCTTTTCATGA-3' ; reverse, 5'-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3' ; concentration finale 400 nM), 0,25 µl de sonde à 10 µM (5' FAM-CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTGGTATC-3' BHQ1 ; concentration finale 100 nM) selon le programme PCR suivant : 95°C pendant 3 minutes suivi de 45 cycles de 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 1 minute. Le logiciel BioRad CFX Manager a été utilisé pour analyser les courbes d'amplifications et déterminer les valeurs de Ct (Cycle threshold).

Si les oocystes étaient infectieux, la quantité d'ADN dans les puits avec cellules était plus élevée que dans les puits sans cellules car les oocystes avaient proliféré. Les Ct des puits avec cellules étaient donc plus précoces que les Ct des puits sans cellules. Un delta Ct a donc pu être calculé en soustrayant le Ct obtenue à partir des puits infectés sans cellules et le Ct obtenue à partir des puits infectés contenant des cellules (DeltaCt = Ct sans cellules – Ct avec cellules). Si le deltaCt était ≥ 1 , cela indiquait que le parasite était capable de se multiplier et qu'il était donc viable et infectieux.

2.6 Imageries

2.6.1 Microscopie confocale

Afin d'étudier la potentielle phagocytose des oocystes de *C. parvum* par *A. castellanii* et *V. vermiformis*, des analyses en microscopie confocale ont été réalisées. Pour cela, les échantillons ont été préparés de la manière suivante : un biofilm de *P. aeruginosa* a été formé (comme décrit précédemment dans des boîtes MatTek 35 mm glass bottom dishes plates (MatTek corporation, Ashland, USA), Après 24h de développement du biofilm, une suspension contenant 5×10^5 cellules d'*A. castellanii* ou *V. vermiformis* et 5×10^5 cellules de *C. parvum* en eau stérile a été ajoutée. Les boîtes MatTek inoculées ont ensuite été incubées à température ambiante jusqu'au marquage par le DAPI et le Crypto-Cel-FITC (TCS Biosciences, Royaume-Uni) des microorganismes.

Pour chaque point de cinétique (0, 1, 3 et 72 heures), le protocole de marquage était le suivant : i) séchage à l'air libre de l'échantillon, ii) ajout de méthanol pour fixer les microorganismes, iii) séchage à l'air libre, iv) lavage au PBS, v) marquage au DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific, France) dilué au 1/5000 pour marquer les amibes libres et les sporozoïtes contenus dans les oocystes de *Cryptosporidium parvum* (pendant 10 min à +37°C), vi) lavage au PBS, vii) immunomarquage des oocystes à l'aide du Crypto-Cel-FITC dilué au 1/3 qui est un marqueur spécifique de la paroi externes des oocystes (pendant 15 min à +37° et en atmosphère humide), viii) lavage au PBS, ix) conservation à +4°C dans 2 mL de PBS et à l'abri de la lumière jusqu'à analyse.

Les échantillons ont ensuite été observés à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser LEICA TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany). Les images ont été acquises avec un objectif à immersion d'huile (x 63) avec une ouverture numérique de 1,4. Une acquisition séquentielle a été réalisée pour éviter le chevauchement des spectres d'émission des marqueurs fluorescents afin d'augmenter la qualité des images.

Le DAPI et le Crypto-Cel-FITC ont été excités à 405 et 488 nm respectivement et leurs émissions de fluorescence ont été recueillies entre 425 et 475 nm pour le DAPI et 490 et 530 nm pour le Crypto-Cel-FITC sur un détecteur de comptage de photons (HyD, Leica Microsystems, Allemagne). Une acquisition en Z-stack a été réalisée pour obtenir une image 3D des échantillons. Le traitement des images a été effectué avec ImageJ.

2.6.2 Vidéo

Les interactions entre *C. parvum* et *A. castellanii* ont été observés sous forme de vidéos. Pour cela, les microorganismes ont été mis en contact à la concentration de 10^5 /mL (MOI = 1) dans des boîtes MatTek et ont été observés sur le video-microscope CellDiscoverer 7, Zeiss. Les vidéos ont été obtenues avec un objectif à immersion à eau (x 50).

2.6.3 Microscopie Électronique à Transmission (MET)

Pour visualiser la potentielle présence des oocystes de *C. parvum* à l'intérieur des trophozoites d'*A. castellanii*, la MET a été utilisée en complément de la microscopie confocale. Trois différentes conditions ont été observées. La première était la condition témoin ou des suspensions contenant 2×10^6 oocystes/mL et 10^6 amibes/mL ont été observés en MET après 3h d'incubation à +4°C dans du PBS. La deuxième condition était la condition planctonique ou une suspension contenant 13×10^6 /mL oocystes et amibes libres (MOI=1) a été observé après 3h de temps de contact à + 4 °C dans du PBS.

Enfin la troisième condition était la condition biofilm ou les différents microorganismes ont été mis en contact à la concentration de 4×10^6 /mL (MOI = 1) pendant 3h dans un biofilm d'*E. coli* pendant 3h à la concentration de 4×10^6 microorganismes/mL. Le biofilm a été formé au préalable dans des plaques 24 puits comme décrit dans la partie biofilm.

Après les 3h d'incubation, les échantillons ont été préparés avant de pouvoir être observés en MET. Tout d'abord, les échantillons ont subi une préfixation avec du glutaraldéhyde dans du tampon Sørensen 0.1 M puis une post fixation dans du tétr oxyde d'osmium. L'échantillon a ensuite été soumis à une étape de déshydratation par des bassins d'éthanol suivi d'une étape d'imprégnation avec de la résine SPURR puis d'une étape d'inclusion et de polymérisation aboutissant à la formation de blocs de résines. Ces résines ont ensuite été coupées de manière semifine (0.8 à 1 μ m) puis ultrafine (65 à 90 μ m), ces dernières qui ont été recueillies sur les grilles en cuivre.

Les grilles en cuivre ont été observé en MET (microscope CM 10, Philips) et les négatifs obtenus ont ensuite été développés.

3 Évaluation de l'effet de traitements de désinfection

L'interaction entre *C. parvum* et *A. castellanii* ou *V. vermiformis* a été étudiée en présence de différents biocides pouvant être rencontrés lors des processus de traitement de l'eau. Ces biocides étaient les suivants : hypochlorite de sodium aux concentrations de 100 ppm pendant 1 heure à +4°C, hypochlorite de sodium 36 000 ppm pendant 30 min à +4°C (eau de javel 3,6 CA, Carrefour, Mont-Saint-Aignan) et Hydroxyde de Sodium 20% pendant 1 heure à température ambiante (NaOH, Sigma, France). L'interaction a également été étudiée après congélation à - 80°C dans du PBS pendant 48 heures et après chauffage au bain marie à + 95°C dans du PBS pendant 15 minutes afin d'avoir des témoins d'inactivation des oocystes. Enfin une condition témoin négatif a également été réalisée dans du PBS pendant 1h à + 4 °C

Des suspensions contenant des oocystes de *C. parvum* et *A. castellanii* ou *V. vermiformis* ont été réalisées en eau stérile à la concentration respective de 10⁵ oocystes/mL et de 10⁶ amibes libres/mL. Ces suspensions ont été incubées pendant 2 heures à + 4°C puis ont été centrifugées à 3000 G pendant 30 minutes. Les traitements biocides ou du PBS pour les conditions témoins ont été rajoutés.

Les suspensions ont ensuite été centrifugées à 3000 G pendant 30 minutes deux fois de suite et du PBS ou du milieu de co-culture a été rajouté dans les tubes. Du PBS pour dénombrer les différents micro-organismes sur lame kova® en microscopie optique et du milieu de co-culture pour infecter les cellules HCT-8 et évaluer l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*. Pour les conditions hypochlorite de sodium 36 000 ppm et NaOH 20% les suspensions ont été centrifugées à 3000 G pendant 30 minutes car le traitement était encore trop présent dans les tubes et la coloration au bleu de trypan n'était pas visible en microscopie.

Pour la présentation des résultats, les graphiques représentant l'abattement des différents micro-organismes, le log₁₀ d'abattement a été calculé par rapport à la condition témoin (sans traitement).

3.1 Évaluation des interactions chimiques entre *C. parvum* et *A. castellanii*

Afin d'étudier les interactions chimiques exclusives entre les oocystes de *C. parvum* et *A. castellanii* des inserts de culture cellulaire (5 µm de diamètre de pores) ont été utilisés (Nunc™ Thermo Fisher Scientific, France). Les inserts ont été inoculés avec 10⁵ cellules d'*A. castellanii*. En parallèle, une plaque 24 puits (Dutscher, France) a été inoculée avec 10⁵ oocystes de *C. parvum* par puit en eau stérile.

Les inserts inoculés avec *A. castellanii* ont été déposés par-dessus les puits contenant les oocystes de *C. parvum* afin d'empêcher tout contact physique entre les oocystes et les amibes tout en permettant les interactions chimiques. Après 3h d'incubation à température ambiante, les inserts ont été retirés et les oocystes contenus dans les puits ont été récupérés. Une CC-qPCR a été réalisée (comme décrit précédemment) afin d'évaluer l'infectiosité des oocystes.

4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du site de traitement en ligne des données Biostatgv (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>). Pour chaque point de cinétique, le test de Student a été appliqué pour comparer les conditions deux à deux et pour comparer la valeur au temps initial de la valeur au temps final de chaque condition. Les données ont été considérées comme significatives pour une p-value ≤ 0.05 . Pour chaque graphique, est indiqué par N, le nombre de réplicats indépendants de l'expérience réalisée.

Résultats et Discussion

Étude des interactions entre *C. parvum* et amibes libres en planctonique et en biofilm

Cette partie a porté sur les interactions entre *C. parvum* et amibes libres et est présentée sous forme d'article. Elle a fait l'objet de deux communications affichées (sous forme d'e-poster à l'ECCMID en juin 2021 et de poster à la SFP-SFMM en octobre 2021 à Lyon) et de deux communications orales (à la SFP-SFMM en juin 2022 à Rouen et lors d'un webinar pour la section jeunes microbiologistes de la SFM en novembre 2022). L'article est en cours de soumission.

1 Interactions between free living amoebae and *Cryptosporidium parvum* in both planktonic and biofilm conditions.

L'article est présenté sur les pages suivantes

Interactions between free living amoebae and *Cryptosporidium parvum* in both planktonic and biofilm conditions.

Marion Lefebvre ¹, Romy Razakandrainibe ^{1,2}, Damien Schapman ³, Arnaud François ^{1,4}, Damien Genty ⁴, Ludovic Galas ³, Isabelle Villena ⁵, Loic Favennec ^{1,2} and Damien Costa ^{1,2,*}

¹ University of Rouen, Laboratory of Parasitology-Mycolology, EA7510 ESCAPE, Normandie, Rouen, France; marionlfb@hotmail.com

² National Reference Center Expert Laboratory, University Hospital of Rouen, Normandie, Rouen, France; romy.razakandrainibe@univ-rouen.fr, loic.favennec@chu-rouen.fr, damien.costa@chu-rouen.fr

³ Normandie University, UNIROUEN, INSERM, PRIMACEN, 76000 Rouen, France; damien.schapman@univ-rouen.fr, magalie.benard@univ-rouen.fr, ludovic.galas@univ-rouen.fr

⁴ Department of anathomopathology, University Hospital of Rouen, Normandie, Rouen; arnaud.francois@chu-rouen.fr, damien.genty@chu-rouen.fr

⁵ Reims Champagne-Ardenne University, Laboratory of Parasitology-Mycolology, EA7510 ESCAPE, Reims, France; ivillena@chu-reims.fr

* Correspondence: Damien.costa@chu-rouen.fr; Tel.: +33 02 32 88 41 75

Abstract: From 2004 to 2016, *Cryptosporidium* was responsible for 905 (60%) of worldwide reported waterborne outbreaks caused by protozoan parasites. Free Living Amoebae (FLA) and *Cryptosporidium* oocysts occasionally share the same environment. The aim of this study was to evaluate interactions between oocysts of *C. parvum* and two common FLA (*Acanthamoeba castellanii* and *Veramoeba vermiformis*) in water environment. Interactions were studied in both planktonic and biofilm conditions over time. Encystment and survival of FLA were evaluated by microscopy using trypan blue vital coloration. Oocysts were enumerated on microscopy. Potential phagocytosis was evaluated by several microscopic approaches. Oocysts infectivity was evaluated by cell culture associated with quantitative PCR. Occasional phagocytosis of *C. parvum* by FLA was documented. However, oocysts concentrations did not decrease significantly. Due to physical interactions, the infectivity of oocysts was transiently decreased in presence of *A. castellanii*. Additionally, the biofilm condition could favor the persistence or even the proliferation of oocysts over time. This study clearly demonstrated interactions between *C. parvum* and FLA depending on conditions. Influence on *C. parvum* infectivity is specifically interesting. Further knowledge of mechanisms implicated in decrease of oocysts infectivity in presence of *A. castellanii* will potentially be of great interest, especially for therapeutical approaches.

Keywords: *Cryptosporidium*; Free living amoebae; interactions; phagocytosis; infectivity; biofilm.

1. Introduction

Cryptosporidium is an intracellular protozoan parasite, which has a global impact on the health of millions of people and animals worldwide for which there is currently no effective chemotherapy. Cryptosporidiosis cause gastroenteritis characterised primarily by water diarrhoea, nausea, vomiting and abdominal pain [1]. In immunocompetent, cryptosporidiosis is often self-limited but can evolve chronically, sometimes leading to post-infection irritable bowel syndrome or even sometimes implicated in colon cancer [2–5]. Regarding most vulnerable patients (children, immunocompromised), symptoms are more severe and could lead to death mainly due to dehydration [6]. The Global Enteric

Multicenter Study (GEMS) revealed that *Cryptosporidium* was the second leading cause (5–15%) of moderate to severe diarrhea in infants in countries of sub-Saharan Africa and South Asia [7,8]. Currently, a total of 42 species of *Cryptosporidium* were described, infecting a wide variety of hosts. Among them, 20 species could infect humans. However, only two species clearly dominate the human epidemiology: *C. parvum* and *C. hominis* [9]. These two species are responsible for more than 90% of human cryptosporidiosis [10]. Species distribution depend on geography and socioeconomic conditions. It has been reported that in industrialized nations such as in European countries, the USA, and Australia, *C. parvum* and *C. hominis* were equally distributed [11]. However, in France, *C. parvum* have a higher prevalence (72%) than *C. hominis* (24%). Conversely, *C. hominis* has been reported as the dominant species in developing countries mainly due to a direct contamination and poor hygiene conditions [12,13]. Contamination occurred by oocyst ingestion and may be direct (person-to-person and animal-to-person) or indirect (ingestion of contaminated water or food) [14,15]. Both *C. hominis* and *C. parvum* are concerned by both direct and indirect transmission. The main difference is observed on direct transmission where *C. hominis* is mainly transmitted by interhuman contact (adults or children) whereas *C. parvum* is mainly transmitted by animal contact [1]. For immunocompetent, the infectious dose 50% (DI50) was estimated at 132 oocysts for *C. parvum* [8,9].

Regarding indirect way of transmission, water was often described as a vehicle for *Cryptosporidium* oocysts. As example it has been reported in meta-analysis a global prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in 36% of investigated water: 25,7% in treated water, 40,1% in untreated water, 25,5% in drinking water and 7,5% in swimming pool [10]. Oocysts are very resistant in the environment. Oocysts survival has been described for up to 18 months at +4°C and up to 7 months at +15°C in water [16,17]. To inactivate *Cryptosporidium* oocysts, temperature must exceed +72,4 °C during at least one minute or +64,2 °C during 5 minutes or drop below -70°C during at least one hour [18]. In addition, oocysts are resistant to water disinfection treatment, especially chlorine [19]. It has been shown that for inactivate 99% of oocysts they had to be exposed to 80 mg/L of free chlorine for 2 hours and to inactivate 100% of them, they needed to be exposed to 8 to 16 g/L of free chlorine during 24h [19,20]. It could at least partially explain why *Cryptosporidium* was frequently reported as responsible of waterborne outbreaks. Between 2011 and 2016, *Cryptosporidium* was responsible for 63% of reported outbreaks due to protozoan waterborne transmission and was reported as the second leading cause of diarrheal disease and death in children in developing countries [21–23]. The most cited outbreak is certainly the Milwaukee ones which occurred in 1993. More than 400 000 people were infected after contamination of drinking water system leading to 4000 hospitalisation and 69 deaths [24]. Between 2009 and 2017, in United States, 444 cryptosporidiosis outbreaks were described and 183 (41.2%) from water origin. A majority of outbreaks due to contaminated recreational waters were also reported in England and Wales (46%) [25]. To resume, water is undeniably a favourable environment for oocysts dissemination and survival such as many microorganisms. It could lead to some interesting interactions between microorganisms. Among them, free living amoebae (FLA) have to be considered. FLA are protozoan parasite, ubiquitous of hydric and telluric environment [26,27]. It has been reported that free living amoebae were found in 20-30% of domestic tap water samples [28] and 68,9% in hospitals ones [29]. Two FLA species are predominant in the environments: *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*) and *Vermamoeba vermiformis* (*V. vermiformis*). *A. castellanii* has been extensively studied in the literature however it has been shown that the density of *V. vermiformis* in water and in biofilms was higher than *A. castellanii* and in particular in hot water systems [30–34]. Their prevalence in water networks is associated with biofilms. Biofilms serve as feeding grounds for the FLA and FLA play a role in the reduction of bacterial biomass thanks to phagocytosis [26,35].

FLA present two developmental stages, a vegetative feeding ones (trophozoite), and a resistant ones (cyst) that provides protection to harsh environmental conditions, such as changes in temperature, pH or even biocides and disinfectant exposure [36]. Encysted

FLA can survive at least 24 years at +4°C in water [35,37] or over 20 years in a completely dry environment [35,38]. In addition, FLA are very resistant to halogenated treatments (chlorine, bromine, iodine) widely used for water and surface disinfection [39,40]. For example, a concentration of 15 mg/L of free chlorine was necessary to eliminate more than 4 log₁₀ cysts of *V. vermiformis* and 2500 mg/L to eliminate between 2 and 6 log₁₀ cysts of *Acanthamoeba* sp. [41,42]. Only four genera/species of FLA were described as direct human pathogens: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* and *Sappinia diploidea* [27,43]. FLA are responsible of severe/lethal infections mainly due to treatments resistance. As example, FLA keratitis frequently lead to blindness [44] and granulomatous amoebic encephalitis result in haemorrhagic necrosis of the central nervous system [26]. Another example with *Naegleria fowleri* which is responsible from primary amoebic meningoencephalitis in immunocompetent individuals [26], resulting in a rare acute fulminant infection of the central nervous system with fatal outcome. FLA are also implicated indirectly in human pathology thanks to their ability to serve as hosts for others pathogens [45]. Indeed, FLA are able to phagocytose a large variety of microorganisms, but someones are able to resist to phagocytosis: the Amoeba-Resisting Bacteria (ARB). By serving as host for ARB, FLA play both a protective role and facilitate dissemination of ARB in the environment. Bacteria such as *Legionella* sp. or *Listeria monocytogenes* multiply inside the amoeba before being disseminated in environment [46]. Out of 539 reported bacterial pathogenic species to humans and/or animals, 18,9% (102) were described as ARB [35]. Interactions with FLA were also reported with viruses (*Adenoviridae*, *pithivirus*...), fungi (*Cryptococcus neoformans*, *Candida* sp. ...) or even protozoan (*Toxoplasma gondii*) [26,47,48].

The aim of this study was to investigate the potential interactions between *C. parvum* oocysts and two common FLA species: *A. castellanii* and *V. vermiformis* in water in both planktonic and biofilm conditions. Hypothesis were that FLA could phagocytose *Cryptosporidium* oocysts and consequently been used as predators to manage *Cryptosporidium* contamination in environment. In contrary, oocysts could resist to FLA phagocytosis modifying both FLA survival and oocysts virulence. To our knowledge such interactions were never previously investigated in water in both planktonic and biofilm conditions combining both microscopy and infectivity evaluation.

2. Materials and Methods

Strains

The used strains of *C. parvum* were isolated from stool samples of infected calves (from the National Institute of Agricultural Research, Nouzilly, France). Isolates were obtained from successive batches of feces from infected calves. More precisely, oocysts were isolated by ImmunoMagnetic Separation (IMS) using the Isolate for IMS of *Cryptosporidium* oocysts kit (TCS biosciences, UK) according to manufacturer's recommendation. Purified oocysts were stored at +4°C in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, France) solution until use.

A. castellanii (ATCC 30234) and *V. vermiformis* (ATCC 50803) strains were cultivated axenically in 25 cm² flasks (Falcon®, Dutscher, France) in sterile Peptone-Yeast extract-Glucose medium (PYG) and incubated at +28°C. The PYG medium contained for 1L of distilled water: 20g proteose peptone (BD Difco, Temse, Belgium), 1g yeast extract (BD Difco), 0,98 g MgSO₄·7H₂O, 1 g sodium citrate·2H₂O, 0,02 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 0,34 g KH₂PO₄, 0,394g Na₂HPO₄·7H₂O, 9g glucose and 0,059g CaCl₂ according to the protocol described by Coulon et al. [49]. After 5 days of incubation at +28°C, suspensions of FLA were obtained scrapping the flasks using a cell scrapper (Nunc™ Thermo Fisher Scientific, France). After centrifugation (1000G during 5 minutes), the pellet was washed one times and suspended in 3 mL of sterile water before counting on kova-slide (Dutsher, France).

The ATCC 27853 strain of *Pseudomonas aeruginosa* and a clinical strain of *E. coli* were used. The bacterial strains were cultivated on blood agar (Biorad, France) and incubated at

room temperature before use. Every 7 days, the *P. aeruginosa* and *E. coli* strains were sub-cultured.

Cell culture

Human ileocaecal adenocarcinoma HCT-8 cell lines (ATCC CCL-224) were used for cell culture investigations. HCT-8 cells were maintained in Rosewell Park Memorial Institute « RPMI » 1640 medium with glutamine (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 5% of heat-inactivated fetal bovine serum (Eurobio, Les Ulis, France), 100 UI/mL of penicillin (Corning™; Thermo Fisher Scientific, France) and 100 pg/mL of streptomycin (Corning™; Thermo Fisher Scientific, France). Cultures were done in Falcon flasks (75 cm²) (Falcon®, Dutscher, France) at +37°C and 5% CO₂ atmosphere. HCT-8 cells were re-suspended twice a week until use.

Kinetic of interactions (planktonic condition)

A. castellanii or *V. vermiformis* and *C. parvum* were co-incubated in sterile water during several days. Each strains were incubated at +4°C during 28 days in falcon tube (Falcon®, Dutscher, France) at the same concentration of 10⁶ cells/mL (v/v) for a MOI (Multiplicity Of Infection) = 1. Interactions were evaluated overtime: i) microscopically for FLA cysts numeration and viability assay (using trypan blue 0.4% (v/v) (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, France)) ii) microscopically for numeration of *C. parvum* oocysts and iii) by qPCR to evaluate infectivity of *C. parvum* oocysts according to following corresponding section.

Kinetic of interactions (biofilm condition)

One mL of a suspension of optical density at 0.5 McFarland of *P. aeruginosa* was inoculated in 24-well plates (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Denmark). After 24h of incubation at room temperature, supernatant was removed and each well was washed three times using sterile water. Presence of biofilm was confirmed in reverse microscopy for each well. Suspensions of FLA and/or *C. parvum* oocysts were inoculated on biofilm coated wells at the quantity of 5x10⁵ cells and incubated at room temperature during a maximum of 7 days. For each kinetic point, wells were rinsed three times with sterile water, then, biofilms were scrapped in 500 µL of sterile water and transferred in 1.5 mL eppendorf tubes (eppendorf™, Thermo Fisher Scientific, France). Microbial interactions were evaluated as described in planktonic section.

Infectivity evaluation of *C. parvum* oocysts

To evaluate infectivity of oocysts, we adapted a qPCR method combined to HCT-8 cell culture previously published by Kubina *et al.* [50]. Briefly, HCT-8 cells were cultivated in 96-well plates (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Denmark) (2x10⁴ cells per well) at +37°C with 5% CO₂ to obtain about 90% confluence after 72h of cultivation. Confluent HCT-8 cells have been then infected with a co-culture medium containing *C. parvum* oocysts (10³ oocysts per well) during 48h. In parallel, wells without HCT-8 cells were inoculated with *C. parvum* oocysts in the same conditions. DNA was extracted using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's recommendations. DNA was then quantified by qPCR (primers: Crypto-F: 5'CGCTTCTAGCCTTTTCATGA 3, CRYPTO-R: 5' CTTACAGTGTGTTTGCCAAT 3' and probe CRYPTO P: FAM 5'CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTGGTATC 3' BQH1) according to the following PCR program: 95°C during 3 min; 95°C during 15 sec and 60°C during 60 sec repeated 45 times. Differences of obtained Ct values (named DeltaCt) were calculated subtracting Ct values obtained from infected wells without HCT-8 cells to Ct values obtained from infected wells with HCT-8 cells. Due to viable oocysts replication on HCT-8 infected cells, more delta Ct were important, more oocysts have proliferated.

Evaluation of potential chemical interactions

To study influence of exclusive chemical contact between *C. parvum* and *A. castellanii*, we used 5 µm cell (Nunc™ Thermo Fisher Scientific, France). Suspensions of sterile water loaded with 10⁵ *C. parvum* oocysts were inoculated in a 24-wells plate. Additionally, inserts were loaded with *A. castellanii* sterile water suspensions at the same concentration.

Loaded inserts were dropped on previously oocysts inoculated wells to block physical contact between *C. parvum* oocysts and *A. castellanii* while allowing chemical interactions. After 3h of incubation at room temperature, inserts were removed and suspensions of oocysts recovered from wells. A CC-qPCR was performed to evaluate oocysts infectivity as previously described

Imagery

Confocal microscopy

On MatTek's 35 mm glass bottom dishes plates (MatTek corporation, Ashland, USA), a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* DO: 0,5 was formed during 24h. Then, the biofilm was inoculated with *A. castellanii*/*V. vermiformis* and *C. parvum* at the same concentration (5×10^5 cells) during 1 and 3 hours at room temperature. For each kinetic point, the microorganisms were labelled according to the following protocol: i) air drying of plates, ii) addition of methanol, iii) air drying, iv) PBS washing, v) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific, France) labelling at 1 :500 dilution to mark amoebae as well as sporozoites contained in *C. parvum* oocysts (10 min at + 37°C), vi) PBS washing, vii) labelling with 1/3 diluted Crypto-Cell-FITC (TCS Biosciences, UK) to mark the outer wall of oocysts (15 min incubation at + 37°C in humid atmosphere), viii) PBS washing, ix) Store at + 4°C in 2 mL of PBS. Samples were then observed using a Leica TCS SP8 confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Germany). Images were acquired with an oil immersion objective (x 63) with a numerical aperture of 1.4. A sequential acquisition was performed to avoid the overlapping emission spectra of the fluorescent markers to increase the quality of these images. DAPI and Crypto-Cel-FITC were excited at 405 and 488 nm, respectively, and their fluorescence emissions were collected between 425 and 475 nm for DAPI and between 490 and 530 nm for Crypto-cel-FITC on photon counting detector (HyD, Leica Microsystems, Germany). A z-stack acquisition was performed to obtain a 3D volume of samples. We used and choosed a 250 nm z-step-size to avoid photobleaching and to optimize acquisition of samples. Image processing (Maximum Intensity Projection, Merging channels, Brightness and Contrast adjustment) was performed with ImageJ.

Video

The interactions between *C. parvum* and *A. castellanii* were observed in video. Microorganisms were incubated at the concentration of 10^5 cells/mL (MOI = 1) in MatTek dishes and observed on the CellDiscoverer 7, Zeiss video microscope. Videos were obtained with a water immersion objective (x 50).

Transmission electronic microscopy (TEM)

To visualize the potential presence of *C. parvum* oocysts inside *A. castellanii* trophozoites, TEM was used in addition to confocal microscopy. Three different conditions were observed. The first one was the control condition where suspensions containing 2×10^6 oocysts/mL and 10^6 amoebae/mL were observed in TEM after 3h of incubation at +4°C in PBS. The second condition was the planktonic condition where 13×10^6 cells/mL were co-incubated (MOI =1) during 3h at +4°C in PBS. Finally the last condition was the biofilm condition where 4×10^6 cells/mL (MOI = 1) were co-incubated during 3h in a biofilm of *E. coli*. The biofilm was previously formed in 24-well plates as described in the biofilm section. After 3h of incubation, samples were pre-fixed with gluteraldehyde in 0.1 M Sørensen buffer and the post-fixed in osmium tetroxide. Sample were then subjected to a dehydration step with ethanol baths followed by an impregnation step with SPURR resin and then an inclusion and polymerization step leading to the formation of resin blocks. These resins were then cut into semi-fine (0.8 to 1 µm) and ultra-fine (65 to 90 µm) particles, which were collected on the copper grids. The copper grids were observed in TEM (CM 10 microscope, Philipps) and the negatives obtained were then developed.

Statistical analysis

Student's test was used to compare the data. For a p-value < 0.05, the data were considered significantly different.

3. Results

3.1. Numeration of *C. parvum* oocysts and FLA

In planktonic condition, concentration of *A. castellanii* decreased from 5,58 +/- 0,11 log₁₀/mL at D0 (Day 0) to 5,12 +/- 0,18 log₁₀/mL at D28 in presence of *C. parvum* oocysts (p-value < 0,001). In absence of oocysts, *A. castellanii* decreased from 5,56 +/- 0,13 log₁₀/mL at D0 to 5,27 +/- 0,06 log₁₀/mL at D28 (p-value < 0,001) (Figure 1A). Regarding each kinetic point: no significant difference was observed with or without oocysts. Similar results were obtained with *V. vermiformis* (data not shown). The concentration of *C. parvum* oocysts remained constant over time and was not significantly affected by the presence of *A. castellanii* or *V. vermiformis* (figure 1B).

In biofilm condition, the amount of *A. castellanii* decreased over time from 4,22 +/- 0,08 log₁₀ to 3,41 +/- 0,21 log₁₀ without *C. parvum* oocyst (p-value < 0,001). In presence of oocysts, the quantity of *A. castellanii* remained stable over time in the studied conditions (figure 1C). Significant differences were observed with or without oocysts co-incubation at each studied kinetic point except at day 1. For *V. vermiformis* the results were similar (data not shown). In presence of *A. castellanii*, the amount of *C. parvum* remained stable over time but, without *A. castellanii*, the amount of oocysts increased significantly from 5,02 +/- 0,04 log₁₀ to 5,34 +/- 0,06 log₁₀ (a global two fold increase) (p-value < 0,001) (Figure 1D). Similar results were observed with *V. vermiformis*.

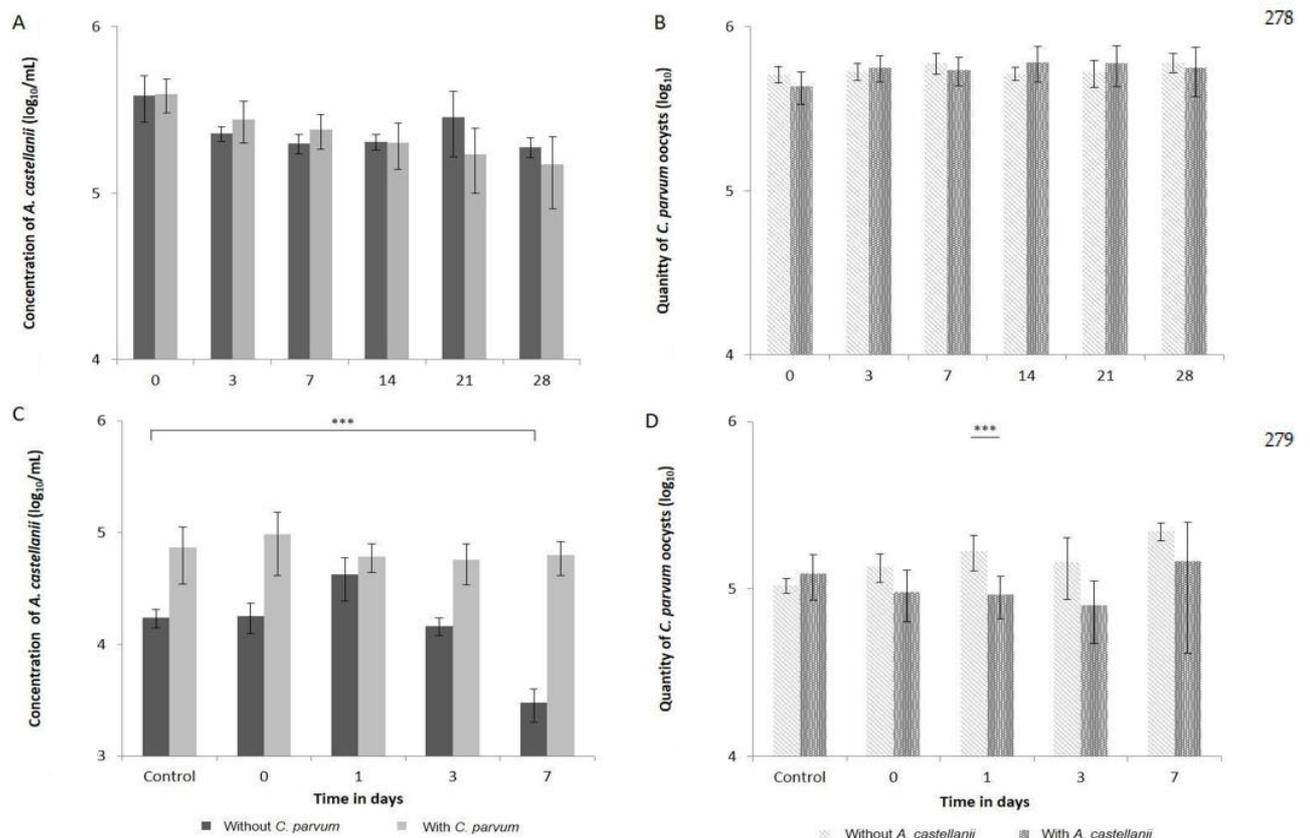


Figure 1 Numeration of microorganisms. *A. castellanii* with/without oocysts over time in planktonic (1A) and in biofilm condition (1C) and numeration of *C. parvum* oocysts with/without *A. castellanii* over time in planktonic (1B) and biofilm condition (1D). p-value: *** < 0,001. N=3. (magnification x 200 for *A. castellanii* and x 400 for *C. parvum*)

3.2. Encystment of FLA

Regarding encystment of *A. castellanii* in presence of *C. parvum* oocysts (figure 2A): in planktonic condition, percentage of cysts tends to increase over time passing from 16,61% +/- 5,47% to 37,16% +/- 11,72% (p-value < 0,001). Without oocysts, encystment increased to a lesser extent ranging from 11,43% +/- 5,66% to 18,68 % +/- 8,41% (p-value < 0,05). Results were similar in biofilm condition (figure 2B). Similarly, the percentage of *V. vermiformis* cysts in biofilm condition, increased significantly over time (p-value < 0,001). Co-incubation with oocysts did not change encystment at each kinetic point (figure 2D). Regarding planktonic condition, in presence of oocysts, the proportion of cysts increased from 4.53% ± 0.58% to 14.92% ± 2.92% (p-value < 0.001) and in the absence of oocysts from 5.4% ± 0.98% to 9.78% ± 1.86% at D28 (p-value < 0.001) (figure 2C).

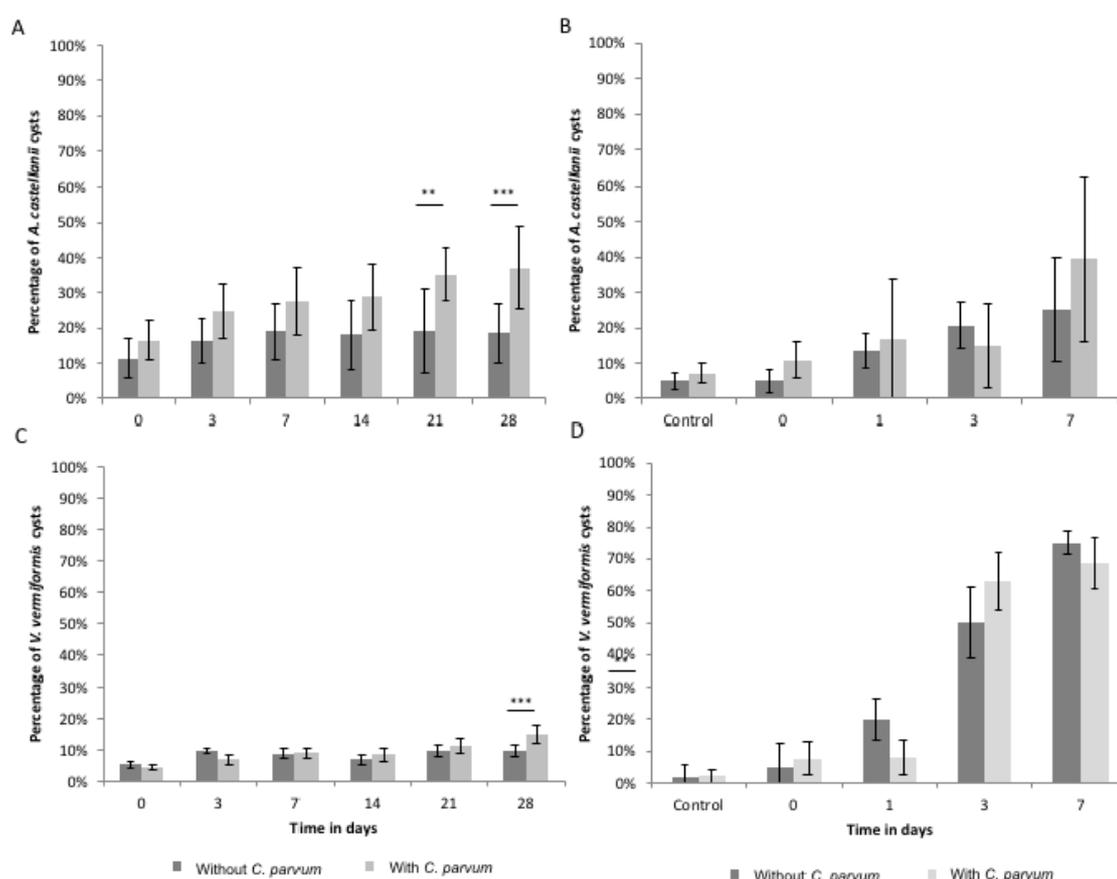


Figure 2. Percentage of: *A. castellanii* cysts in planktonic (2A) and biofilm conditions (2B) and *V. vermiformis* cysts in planktonic (2C) and biofilm condition (2D) overtime with/without oocysts. . p-value: ** < 0,01; *** < 0,001. N=3

3.3. Infectivity of *C. parvum* oocysts

Results showed a significant decrease of Delta Ct in early stages of co-incubation (Figure 3) in comparison to control condition (without *A. castellanii*). It suggests an early lost of infectivity in presence of *A. castellanii*. Additional results showed a maximum decreased of oocysts infectivity at 3 hours of co-incubation with *A. castellanii* (data not shown). Results showed that when *A. castellanii* and *C. parvum* oocysts were not in physical contact, infectivity of oocysts was not altered by presence of *A. castellanii*. However, in presence of *V. vermiformis*, infectivity of *C. parvum* oocysts remained unchanged (data not shown).

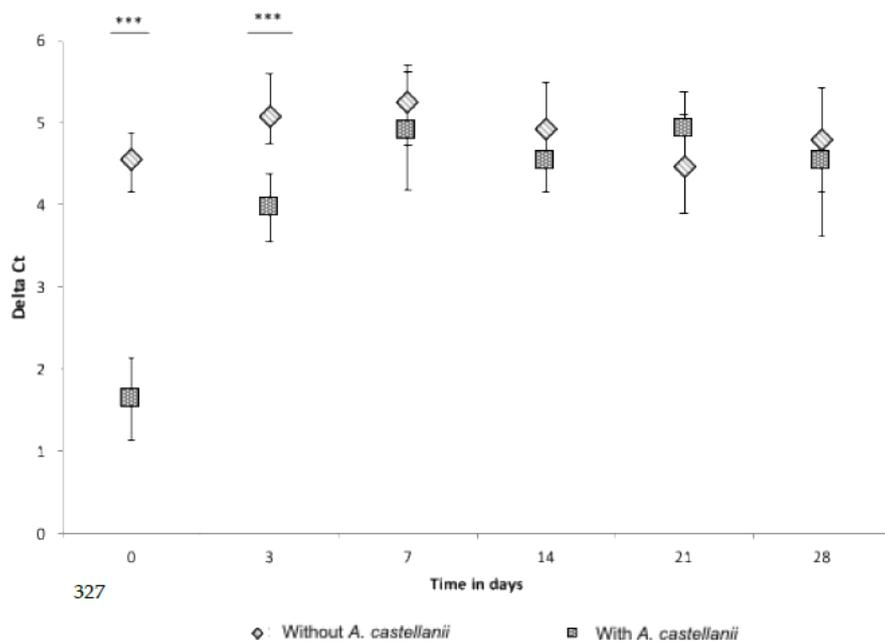


Figure 3 Evaluation of the infectivity of *C. parvum* oocysts over time in presence of *A. castellanii*.
p-value: *** < 0,01. *N* = 3

3.4. Phagocytosis evaluation

A video was done to evaluate interactions between *C. parvum* oocysts and *A. castellanii* (supplemental data 1). On the video, we can see a favour tropism of *A. castellanii* in direction of oocysts. Oocysts seemed sometimes incorporated in FLA but always release over time. Confocal imaging and 3D projection revealed occasional oocyst location inside *A. castellanii* or *V. vermiformis* (Figure 4 A and B). Interestingly, confocal imaging also revealed that *C. parvum* oocysts were often clustered around FLA.

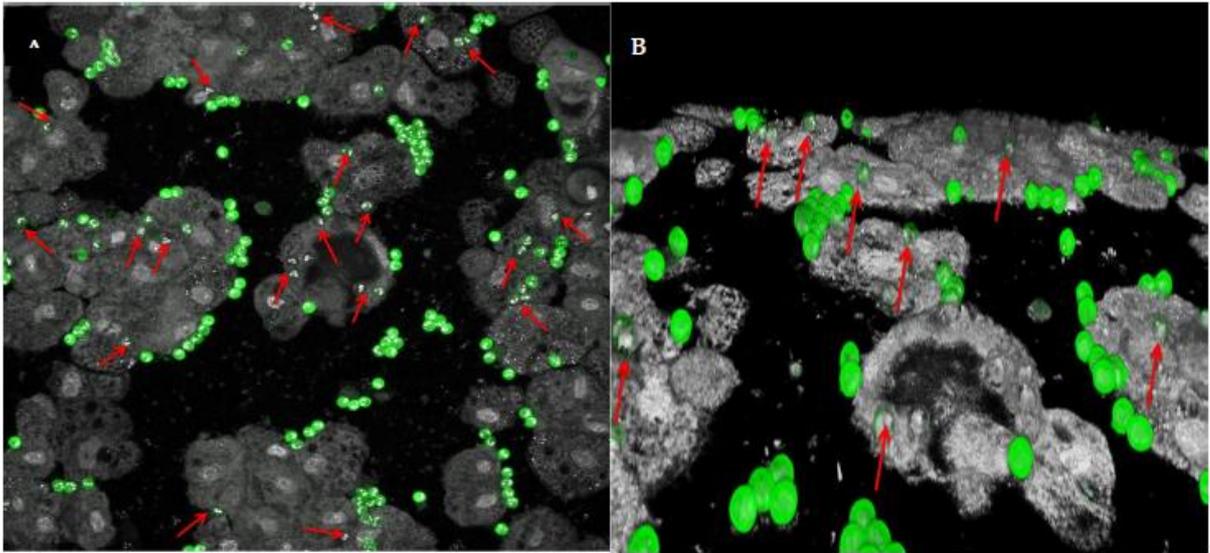


Figure 4 Confocal imaging (A) and 3D projection (B) of co-incubated FLA and *C. parvum* oocysts (green).

337

To complete phagocytosis investigation, transmission electron microscopy was performed. Firstly, each microorganism was observed from monomicrobial condition (Figure 5). Sporozoites and oocysts of *Cryptosporidium parvum* were observed respectively in figure 5A and 5B. Vegetative forms of *A. castellanii* were observed in Figure 5C and 5D.

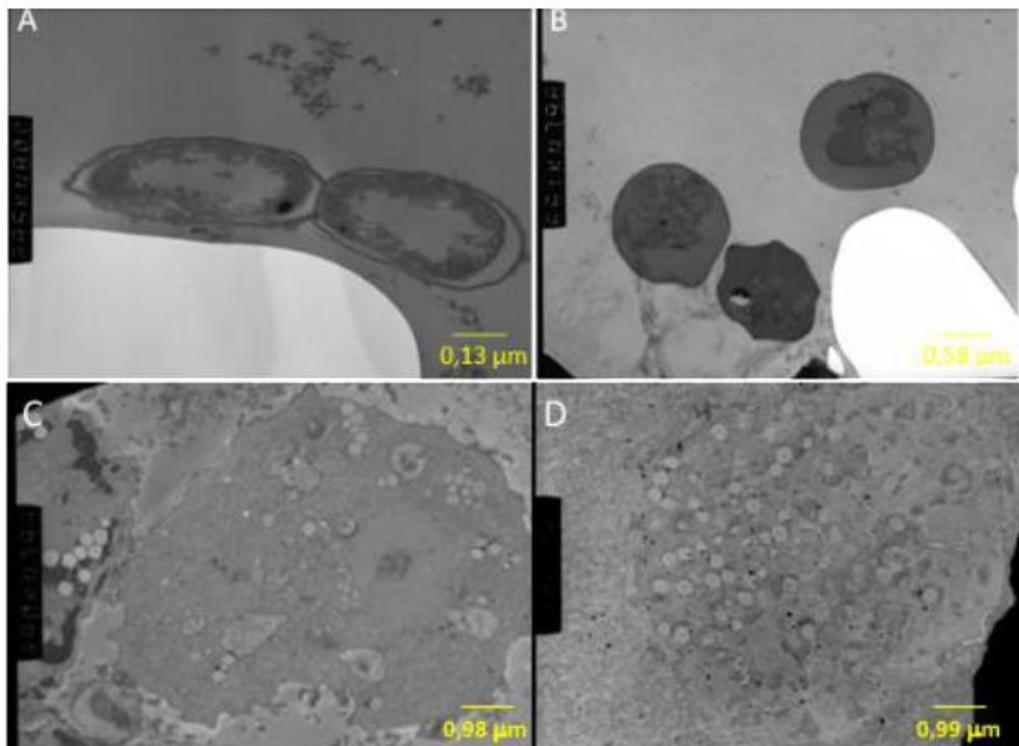
338

339

340

341

342



343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

Figure 5 Images obtained from transmission electronic microscopy of sporozoites (5A), oocysts of *C. parvum* (5B) and vegetative forms of *A. castellanii* (5C and 5D).

355

356

In co-incubation condition, sporozoites were observed inside *A. castellanii* (figure 6A and B). In addition, “digestive-like vacuole” (5–8 μm) were sometimes observed inside *A. castellanii* trophozoites. In size, it could correspond to digested *C. parvum* oocyst. (figure 6C and D).

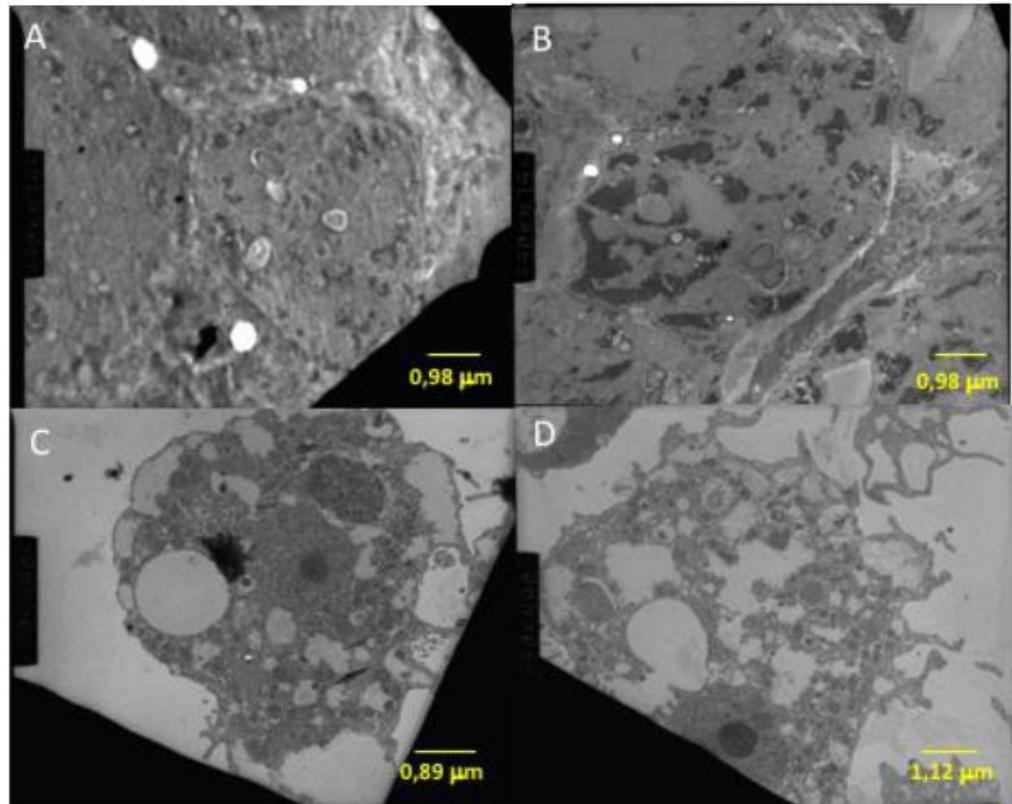


Figure 6 Transmission electron microscopy observations of vegetative forms of *A. castellanii* co-incubated with *C. parvum* in planktonic (6A and 6B) and in biofilm conditions (6C and 6D).

4. Discussion

To date, very few data have been published about interactions between FLA and *Cryptosporidium* oocysts [51–53]. For the first time to our knowledge, the potential interactions between these parasites were evaluated including both complete microscopical (optical, confocal, fluorescent, TEM) and qPCR (for Infectivity evaluation) approaches.

Regarding already published data, De Moraes et al. studied growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* in presence of various bacterial species (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *B. megaterium*, *M. luteus* and *S. aureus*) in non-nutrient saline solution. They demonstrated a dose-dependent proliferative response of *A. castellanii* according to bacterial concentration. A proliferation of *A. castellanii* (6 to 38 fold increase) was observed after addition of 10^9 bacteria/mL corresponding to a multiplicity of infection (MOI) (bacteria : FLA) of 10 000:1 [54]. Without bacteria, *A. castellanii* cells stopped dividing but remained viable and retained their typical trophozoite morphology for 4 to 7 days and thereafter began to encysts [54]. In our study, FLA did not proliferate in the presence of oocysts, with a MOI of 1:1. A higher MOI, in favour of much more oocysts than FLA could potentially lead to FLA proliferation over time. However, such MOI could not be reach due to

the impossibility to cultivate oocysts. Decrease FLA concentration to obtain such MOI will strongly limit observations by microscopy. However, it was shown in the literature that for a MOI of 1:1 (10⁶/mL bacteria and *A. castellanii*), bacteria (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. marescens* and *S. maltophilia*) favoured the growth and survival of *A. castellanii* and that for a higher MOI of 100:1 (bacteria : FLA), bacteria and especially *P. aeruginosa* inhibited the growth of *A. castellanii* [55,56]. It has been shown that FLA proliferation occurs in the presence of various bacteria and that FLA have preferences for certain bacterial species and in particular gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* or *Klebsiella aerogenes* [57]. In addition, it has been reported that FLA cultivated in axenic conditions could not predate bacteria such as *A. baumannii*. Axenic growing condition could thus favour pinocytosis rather than phagocytosis and consequently minimize bacterial interactions [58,59]. In our study, used FLA were axenically cultivated from years, which may affect their phagocytosis ability and potentially limit oocysts interactions.

Interestingly, it has been shown that temperature influence the phagocytosis ability of FLA. After ingestion at +20°C, *Legionella pneumophila* was fully digested by *A. castellanii* but at +37°C, *Legionella pneumophila* could lyse *A. castellanii* [55]. *Parachlamydia acanthamoebae* was lytic for *A. polyphaga* between +32 and +37°C and endosymbiotic between +25°C and +30°C [46]. In our conditions, interactions were studied at +4°C (in planktonic condition) and at room temperature (+20-25°C) in biofilm condition which could explain (at least partially) the differences obtained in the biofilm and planktonic conditions. Since *A. castellanii* both quickly decreased in biofilm condition without co-incubation with *C. parvum* oocysts and encystment increase overtime when co-incubated with oocysts; results seems demonstrate than oocysts could delayed the decline of *A. castellanii*. This phenomenon was described with bacteria. It has been shown that bacteria could delayed and favor the encystment of *A. castellanii* (7 to 8 days without bacteria versus 9 to 16 days; and encystation yield of 0.5 without bacteria versus 4 to 44 depending on the bacterial strain) [54]. In addition, encystment depend on studied FLA strains and probably to their resistance. Both temperature and dessication could, at least partially, explained such differences. *V. vermiformis* seemed more sensitive to desiccation than *A. castellanii*. In the literature, it has been shown that FLA encyst to fight against desiccation and that *Acanthamoeba* sp cysts can survive for up to 20 years in a completely dry environment [38]. Interestingly, in our studied conditions, macroscopic desiccation was observed after 7 days of incubation corresponding to the highest observed encystment rate.

In our studied biofilm condition, the quantity of *C. parvum* oocysts increased progressively overtime (factor 2) without FLA co-incubation. In presence of FLA, such proliferation of oocysts was not observed. Some hypotheses could explain the observed differences: in the absence of FLA, *C. parvum* oocysts could possibly interact with the bacteria supporting the biofilm (i.e *P. aeruginosa*). In literature, it has been shown a 2-3 fold multiplication of oocysts within a mature biofilm of *P. aeruginosa* in 6 days coupled with observation of different *Cryptosporidium* developmental stages (sporozoites, trophozoites, type I and II meronts) [60]. Conversely, other studies have shown that the number of oocysts remained constant in biofilm conditions [61,62]. These discrepancies are possibly related to the difference in biofilm type. The first study used an artificial biofilm of *P. aeruginosa*, and the second one, used a natural biofilm sampled from runoff water. As artificial and natural biofilms have different communities, structures and nutrient levels, oocysts may interact differently. Furthermore, several studies have reported the possible multiplication of *Cryptosporidium* extracellularly in cell-free cultures showing that encapsulation in a host cell was not essential for oocysts multiplication [63–66].

Finally, regarding infectivity of oocysts, a temporary decrease of infectivity was observed in the presence of *A. castellanii*. Investigations revealed that physical interactions between oocysts and *A. castellanii* seemed mandatory for such effect. In addition, it has been strongly observed clusters of oocysts stuck to FLA membrane by SP8 microscopy (not observed by conventional light microscopy because the microorganisms in solution were vortexed before microscopic study). In the literature, agglutination of *Cryptosporidium* oocysts has been observed in raw water, whereas in sterile water no agglutination was observed. This phenomenon may be a response to predation [67]. This defense mechanism has already been reported for *Pseudomonas aeruginosa*. Pickup et al observed the formation of bacteria microcolonies, leading to a reduction in the rate of bacteria ingestion by free-living amoebae [68]. Other mechanisms of resistance to FLA predation have been described in literature such as the presence of a polysaccharide capsule (i.e. *C. neoformans*). *C. parvum* oocysts wall could similarly limit FLA phagocytosis. If no proof of oocyst phagocytosis was observed in TEM (even if we observed potential digestive vacuole coherent in size to oocysts ones), TEM observations clearly demonstrated at least occasional sporozoites phagocytosis by FLA. Consequently, phagocytosis could preferentially occurred on “free” forms of *C. parvum* explaining why oocysts numeration does not decrease overtime in presence of FLA and why no increase of oocysts was observed in biofilm condition in presence of FLA.

5. Conclusions

This study update data already published about FLA and *C. parvum* oocysts interactions including both microscopical and infectivity data. Various microscopical observations finally demonstrated ability of FLA to occasionally phagocytose *C. parvum* depending on the studied conditions. Consequently, survival of FLA was increase in presence of *C. parvum* oocysts. Interestingly, *C. parvum* was able to resist to phagocytosis but its infectivity was temporarily altered. Physical interactions between *A. castellanii* and oocysts appeared essential in the corresponding mechanism of alteration of infectivity. Such interactions were observed in vitro in both planktonic and biofilm conditions. These results open very interesting perspectives according to *Cryptosporidium* microbial interactions and possibility to alter infectivity of oocysts. For example, it could able identification of genes implicated in virulence of *C. parvum* or in resistance to phagocytosis and facilitate development of new therapeutical options in the future. In addition, results throw again discussion about potential oocysts proliferation in biofilm condition.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Video S1: Co-incubation of *C. parvum* oocysts and *A. castellanii*.

Author Contributions: Conceptualization, D. Costa ; methodology, M. Lefebvre, D. Schapman, R. Razakandrainibe, A. François and D. Genty; software, D. Schapman and L. Galas ; validation, I. Villena and L. Favennec; formal analysis, M. Lefebvre ; investigation, M. Lefebvre and D. Costa.; writing—original draft preparation, M. Lefebvre; writing—review and editing, D. Costa, L. Favennec, R. Razakandrainibe and I. Villena; visualization, D. Schapman, L. Galas; supervision, D. Costa, L. Favennec and I. Villena. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Acknowledgments: We are grateful to Christine Imbert and Vincent Delafont, Laboratory of Ecology and Biology of interactions, University of Poitiers, France, for providing ATCC strains of free-living amoebae and the National Institute of Agricultural Research, Nouzilly, France, for providing the strain of *C. parvum* used in this study. We thank Léonie Gricourt for her implication in TEM investigations. We thank Magalie Benard for video acquisition. We thank Nikki Sabourin-Gibbs (Rouen University Hospital), for her help in editing the manuscript.

Conflicts of Interest: “The authors declare no conflict of interest.”

References

1. Cacciò, S.M.; Chalmers, R.M. Human Cryptosporidiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* **2016**, *22*, 471–480, doi:10.1016/j.cmi.2016.04.021.
2. Costa, D.; Razakandrainibe, R.; Valot, S.; Vannier, M.; Sautour, M.; Basmacıyan, L.; Gargala, G.; Viller, V.; Lemeteil, D.; Ballet, J.-J.; et al. Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1358, doi:10.3390/microorganisms8091358.
3. Jadallah, K.; Nimri, L.; Ghanem, R. Protozoan Parasites in Irritable Bowel Syndrome: A Case-Control Study. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* **2017**, *8*, 201–207, doi:10.4292/wjgpt.v8.i4.201.
4. Salem, A.I.; El-Taweel, H.A.; Madkour, M.A.; Abd El-Latif, N.F.; Abd-Elrazeq, E.S. Irritable Bowel Syndrome in Egyptian Patients: Plausible Risk Factors and Association with Intestinal Protozoa. *Trop Doct* **2019**, *49*, 184–188, doi:10.1177/0049475519837112.
5. Sawant, M.; Baydoun, M.; Creusy, C.; Chabé, M.; Viscogliosi, E.; Certad, G.; Benamrouz-Varneste, S. Cryptosporidium and Colon Cancer: Cause or Consequence? *Microorganisms* **2020**, *8*, 1665, doi:10.3390/microorganisms8111665.
6. Chalmers, R.M.; Davies, A.P. Minireview: Clinical Cryptosporidiosis. *Exp Parasitol* **2010**, *124*, 138–146, doi:10.1016/j.exppara.2009.02.003.
7. Kotloff, K.L.; Nataro, J.P.; Blackwelder, W.C.; Nasrin, D.; Farag, T.H.; Panchalingam, S.; Wu, Y.; Sow, S.O.; Sur, D.; Breiman, R.F.; et al. Burden and Aetiology of Diarrhoeal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A Prospective, Case-Control Study. *The Lancet* **2013**, *382*, 209–222, doi:10.1016/S0140-6736(13)60844-2.
8. Ryan, U.; Papparini, A.; Monis, P.; Hijjawi, N. It's Official - Cryptosporidium Is a Gregarine: What Are the Implications for the Water Industry? *Water Res* **2016**, *105*, 305–313, doi:10.1016/j.watres.2016.09.013.
9. Zahedi, A.; Ryan, U. Cryptosporidium – An Update with an Emphasis on Foodborne and Waterborne Transmission. *Research in Veterinary Science* **2020**, *132*, 500–512, doi:10.1016/j.rvsc.2020.08.002.
10. Daraei, H.; Oliveri Conti, G.; Sahlabadi, F.; Thai, V.N.; Gholipour, S.; Turki, H.; Fakhri, Y.; Ferrante, M.; Moradi, A.; Mousavi Khaneghah, A. Prevalence of Cryptosporidium Spp. in Water: A Global Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Sci Pollut Res* **2020**, doi:10.1007/s11356-020-11261-6.
11. Khan, A.; Shaik, J.S.; Grigg, M.E. Genomics and Molecular Epidemiology of Cryptosporidium Species. *Acta Trop* **2018**, *184*, 1–14, doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.023.
12. Guyot, K.; Sarfati, C.; Derouin, F. Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose. *feuilles deBiologie* **2012**, *9*.
13. Ryan, U.; Fayer, R.; Xiao, L. Cryptosporidium Species in Humans and Animals: Current Understanding and Research Needs. *Parasitology* **2014**, *141*, 1667–1685, doi:10.1017/S0031182014001085.
14. Gerace, E.; Presti, V.D.M.L.; Biondo, C. Cryptosporidium Infection: Epidemiology, Pathogenesis, and Differential Diagnosis. *European Journal of Microbiology and Immunology* **2019**, *9*, 119–123, doi:10.1556/1886.2019.00019.
15. Innes, E.A.; Chalmers, R.M.; Wells, B.; Pawlowic, M.C. A One Health Approach to Tackle Cryptosporidiosis. *Trends Parasitol* **2020**, *36*, 290–303, doi:10.1016/j.pt.2019.12.016.
16. Canada, S. Page 4: Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada: document technique - protozoaires entériques: Giardia et Cryptosporidium Available online: [https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/publications/vie-saine/recommandations-pour-qualite-eau-potable-canada-document-technique-](https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/publications/vie-saine/recommandations-pour-qualite-eau-potable-canada-document-technique)

- protozoaires-enteriques-giardia-et-cryptosporidium/page-4-recommandations-pour-qualite-eau-potable-canada-document-technique-protozoaires-enteriques-giardia-et-cryptosporidium.html (accessed on 15 July 2021).
17. Jenkins, M.; Trout, J.M.; Higgins, J.; Dorsch, M.; Veal, D.; Fayer, R. Comparison of Tests for Viable and Infectious *Cryptosporidium Parvum* Oocysts. *Parasitol Res* **2003**, *89*, 1–5, doi:10.1007/s00436-002-0720-6.
 18. Fayer, R.; Trout, J.M.; Jenkins, M.C. Infectivity of *Cryptosporidium Parvum* Oocysts Stored in Water at Environmental Temperatures. *J Parasitol* **1998**, *84*, 1165–1169.
 19. Korich, D.G.; Mead, J.R.; Madore, M.S.; Sinclair, N.A.; Sterling, C.R. Effects of Ozone, Chlorine Dioxide, Chlorine, and Monochloramine on *Cryptosporidium Parvum* Oocyst Viability. *Appl Environ Microbiol* **1990**, *56*, 1423–1428, doi:10.1128/aem.56.5.1423-1428.1990.
 20. Smith, H.V.; McDiarmid, A.; Smith, A.L.; Hinson, A.R.; Gilmour, R.A. An Analysis of Staining Methods for the Detection of *Cryptosporidium* Spp. Oocysts in Water-Related Samples. *Parasitology* **1989**, *99 Pt 3*, 323–327, doi:10.1017/s0031182000059023.
 21. Efstratiou, A.; Ongerth, J.; Karanis, P. Evolution of Monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water. *Water Research* **2017**, *123*, 96–112, doi:10.1016/j.watres.2017.06.042.
 22. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Diarrhoea in 195 Countries: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis* **2018**, *18*, 1211–1228, doi:10.1016/S1473-3099(18)30362-1.
 23. Ryan, U.; Hijawi, N.; Xiao, L. Foodborne Cryptosporidiosis. *International Journal for Parasitology* **2018**, *48*, 1–12, doi:10.1016/j.ijpara.2017.09.004.
 24. 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. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply. *N Engl J Med* **1994**, *331*, 161–167, doi:10.1056/NEJM199407213310304.
 25. Chalmers, R.M.; Robinson, G.; Elwin, K.; Elson, R. Analysis of the *Cryptosporidium* Spp. and Gp60 Subtypes Linked to Human Outbreaks of Cryptosporidiosis in England and Wales, 2009 to 2017. *Parasit Vectors* **2019**, *12*, 95, doi:10.1186/s13071-019-3354-6.
 26. Balczun, C.; Scheid, P.L. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses* **2017**, *9*, E65, doi:10.3390/v9040065.
 27. Król-Turmińska, K.; Olender, A. Human Infections Caused by Free-Living Amoebae. *Ann Agric Environ Med* **2017**, *24*, 254–260, doi:10.5604/12321966.1233568.
 28. Shoff, M.E.; Rogerson, A.; Kessler, K.; Schatz, S.; Seal, D.V. Prevalence of *Acanthamoeba* and Other Naked Amoebae in South Florida Domestic Water. *J Water Health* **2008**, *6*, 99–104, doi:10.2166/wh.2007.014.
 29. Lasheras, A.; Boulestreau, H.; Rogues, A.-M.; Ohayon-Courtes, C.; Labadie, J.-C.; Gachie, J.-P. Influence of Amoebae and Physical and Chemical Characteristics of Water on Presence and Proliferation of *Legionella* Species in Hospital Water Systems. *Am J Infect Control* **2006**, *34*, 520–525, doi:10.1016/j.ajic.2006.03.007.
 30. Delafont, V.; Rodier, M.-H.; Maisonneuve, E.; Cateau, E. *Vermamoeba Vermiformis*: A Free-Living Amoeba of Interest. *Microb Ecol* **2018**, *76*, 991–1001, doi:10.1007/s00248-018-1199-8.
 31. Ovrutsky, A.R.; Chan, E.D.; Kartalija, M.; Bai, X.; Jackson, M.; Gibbs, S.; Falkinham, J.O.; Iseman, M.D.; Reynolds, P.R.; McDornell, G.; et al. Cooccurrence of Free-Living Amoebae and Nontuberculous Mycobacteria in Hospital Water Networks, and Preferential Growth of *Mycobacterium Avium* in *Acanthamoeba Lenticulata*. *Appl Environ Microbiol* **2013**, *79*, 3185–3192, doi:10.1128/AEM.03823-12.

32. Rohr, U.; Weber, S.; Michel, R.; Selenka, F.; Wilhelm, M. Comparison of Free-Living Amoebae in Hot Water Systems of Hospitals with Isolates from Moist Sanitary Areas by Identifying Genera and Determining Temperature Tolerance. *Appl Environ Microbiol* **1998**, *64*, 1822–1824. 546
33. Thomas, V.; Herrera-Rimaru, K.; Blanc, D.S.; Greub, G. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Appl Environ Microbiol* **2006**, *72*, 2428–2438, doi:10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006. 547
34. Wang, H.; Edwards, M.; Falkinham, J.O.; Pruden, A. Molecular Survey of the Occurrence of Legionella Spp., Mycobacterium Spp., Pseudomonas Aeruginosa, and Amoeba Hosts in Two Chloraminated Drinking Water Distribution Systems. *Appl Environ Microbiol* **2012**, *78*, 6285–6294, doi:10.1128/AEM.01492-12. 548
35. Thomas, V.; McDornell, G.; Denyer, S.P.; Maillard, J.-Y. Free-Living Amoebae and Their Intracellular Pathogenic Microorganisms: Risks for Water Quality. *FEMS Microbiol Rev* **2010**, *34*, 231–259, doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x. 549
36. Gomes, T.S.; Vaccaro, L.; Magnet, A.; Izquierdo, F.; Ollero, D.; Martínez-Fernández, C.; Mayo, L.; Moran, M.; Pozuelo, M.J.; Fenoy, S.; et al. Presence and Interaction of Free-Living Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in Water from Drinking Water Treatment Plants. *Science of The Total Environment* **2020**, *719*, 137080, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137080. 550
37. Mazur, T.; Hadaś, E.; Iwaricka, I. The Duration of the Cyst Stage and the Viability and Virulence of Acanthamoeba Isolates. *Trop Med Parasitol* **1995**, *46*, 106–108. 551
38. Sriram, R.; Shoff, M.; Booton, G.; Fuerst, P.; Visvesvara, G.S. Survival of Acanthamoeba Cysts after Desiccation for More than 20 Years. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 4045–4048, doi:10.1128/JCM.01903-08. 552
39. Kilvington, S.; Price, J. Survival of Legionella Pneumophila within Cysts of Acanthamoeba Polyphaga Following Chlorine Exposure. *J Appl Bacteriol* **1990**, *68*, 519–525, doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb02904.x. 553
40. Storey, M.V.; Winiecka-Krusnell, J.; Ashbolt, N.J.; Stenström, T.-A. The Efficacy of Heat and Chlorine Treatment against Thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scand J Infect Dis* **2004**, *36*, 656–662, doi:10.1080/00365540410020785. 554
41. Coulon, C.; Collignon, A.; McDornell, G.; Thomas, V. Resistance of Acanthamoeba Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. *J Clin Microbiol* **2010**, *48*, 2689–2697, doi:10.1128/JCM.00309-10. 555
42. Fouque, E.; Héchard, Y.; Hartemann, P.; Humeau, P.; Trouilhé, M.-C. Sensitivity of Vermamoeba (Hartmannella) Vermiformis Cysts to Conventional Disinfectants and Protease. *Journal of Water and Health* **2014**, *13*, 302–310, doi:10.2166/wh.2014.154. 556
43. Trabelsi, H.; Dendana, F.; Sellami, A.; Sellami, H.; Cheikhrouhou, F.; Neji, S.; Makri, F.; Ayadi, A. Pathogenic Free-Living Amoebae: Epidemiology and Clinical Review. *Pathologie Biologie* **2012**, *60*, 399–405, doi:10.1016/j.patbio.2012.03.002. 557
44. Lorenzo-Morales, J.; Khan, N.A.; Walochnik, J. An Update on Acanthamoeba Keratitis: Diagnosis, Pathogenesis and Treatment. *Parasite* **2015**, *22*, 10, doi:10.1051/parasite/2015010. 558
45. Declerck, P.; Behets, J.; van Hoef, V.; Ollevier, F. Detection of Legionella Spp. and Some of Their Amoeba Hosts in Floating Biofilms from Anthropogenic and Natural Aquatic Environments. *Water Res.* **2007**, *41*, 3159–3167, doi:10.1016/j.watres.2007.04.011. 559
46. Greub, G.; Raoult, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev* **2004**, *17*, 413–433, doi:10.1128/CMR.17.2.413-433.2004. 560
47. Hubert, F.; Rodier, M.-H.; Minoza, A.; Portet-Sulla, V.; Cateau, E.; Brunet, K. Free-Living Amoebae Promote Candida Auris Survival and Proliferation in Water. *Lett Appl Microbiol* **2021**, *72*, 82–89, doi:10.1111/lam.13395. 561

48. Winiecka-Krusnell, J.; Dellacasa-Lindberg, I.; Dubey, J.P.; Barragan, A. *Toxoplasma Gondii*: Uptake and Survival of Oocysts in Free-Living Amoebae. *Experimental Parasitology* **2009**, *121*, 124–131, doi:10.1016/j.exppara.2008.09.022.
49. Coulon, C.; Dechamps, N.; Meylheuc, T.; Collignon, A.; McDonnell, G.; Thomas, V. The Effect of In Vitro Growth Conditions on the Resistance of Acanthamoeba Cysts. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2012**, *59*, 198–205, doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00612.x.
50. Kubina, S.; Costa, D.; Favennec, L.; Gargala, G.; Rousseau, A.; Villena, I.; La Carbona, S.; Razakandrainibe, R. Detection of Infectious *Cryptosporidium Parvum* Oocysts from Lamb's Lettuce: CC-QPCR's Intake. *Microorganisms* **2021**, *9*, 215, doi:10.3390/microorganisms9020215.
51. Gómez-Couso, H.; Paniagua-Crespo, E.; Ares-Mazás, E. Acanthamoeba as a Temporal Vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitol Res* **2007**, *100*, 1151–1154, doi:10.1007/s00436-006-0377-7.
52. Scheid, P.L.; Schwarzenberger, R. Free-Living Amoebae as Vectors of *Cryptosporidia*. *Parasitol Res* **2011**, *109*, 499–504, doi:10.1007/s00436-011-2287-6.
53. Stott, R.; May, E.; Ramirez, E.; Warren, A. Predation of *Cryptosporidium* Oocysts by Protozoa and Rotifers: Implications for Water Quality and Public Health. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2003**, *47*, 77–83, doi:10.2166/wst.2003.0166.
54. de Moraes, J.; Alfieri, S.C. Growth, Encystment and Survival of *Acanthamoeba Castellani* Grazing on Different Bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **2008**, *66*, 221–229, doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00594.x.
55. Marciano-Cabral, F.; Cabral, G. *Acanthamoeba* Spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol Rev* **2003**, *16*, 273–307, doi:10.1128/CMR.16.2.273-307.2003.
56. Wang, X.; Ahearn, D.G. Effect of Bacteria on Survival and Growth of *Acanthamoeba Castellani*. *Curr Microbiol* **1997**, *34*, 212–215, doi:10.1007/s002849900170.
57. Khan, N.A. *Acanthamoeba*: Biology and Increasing Importance in Human Health. *FEMS Microbiology Reviews* **2006**, *30*, 564–595, doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x.
58. Bornier, F.; Zas, E.; Potheret, D.; Laaberki, M.-H.; Coupat-Goutaland, B.; Charpentier, X. Environmental Free-Living Amoebae Can Predate on Diverse Antibiotic-Resistant Human Pathogens. *Appl Environ Microbiol* **2021**, *87*, e00747-21, doi:10.1128/AEM.00747-21.
59. King, J.S.; Kay, R.R. The Origins and Evolution of Macropinocytosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2019**, *374*, 20180158, doi:10.1098/rstb.2018.0158.
60. Koh, W.; Clode, P.L.; Monis, P.; Thompson, R.C.A. Multiplication of the Waterborne Pathogen *Cryptosporidium Parvum* in an Aquatic Biofilm System. *Parasit Vectors* **2013**, *6*, 270, doi:10.1186/1756-3305-6-270.
61. Wolyński, E.A.; Hargreaves, B.R.; Jellison, K.L. Retention and Release of *Cryptosporidium Parvum* Oocysts by Experimental Biofilms Composed of a Natural Stream Microbial Community. *Appl Environ Microbiol* **2009**, *75*, 4624–4626, doi:10.1128/AEM.02916-08.
62. Wolyński, E.A.; Hargreaves, B.R.; Jellison, K.L. Seasonal Retention and Release of *Cryptosporidium Parvum* Oocysts by Environmental Biofilms in the Laboratory. *Appl Environ Microbiol* **2010**, *76*, 1021–1027, doi:10.1128/AEM.01804-09.
63. Hijjawi, N.; Estcourt, A.; Yang, R.; Monis, P.; Ryan, U. Complete Development and Multiplication of *Cryptosporidium Hominis* in Cell-Free Culture. *Vet Parasitol* **2010**, *169*, 29–36, doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.021.
64. Hijjawi, N.S.; Meloni, B.P.; Ng'anzo, M.; Ryan, U.M.; Olson, M.E.; Cox, P.T.; Monis, P.T.; Thompson, R.C.A. Complete Development of *Cryptosporidium Parvum* in Host Cell-Free Culture. *Int J Parasitol* **2004**, *34*, 769–777, doi:10.1016/j.ijpara.2004.04.001.

-
65. Karanis, P.; Kimura, A.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Suzuki, N. Observations on *Cryptosporidium* Life Cycle Stages during Excystation. *J Parasitol* **2008**, *94*, 298–300, doi:10.1645/GE-1185.1. 628
629
66. Zhang, L.; Sheoran, A.S.; Widmer, G. *Cryptosporidium Parvum* DNA Replication in Cell-Free Culture. *J Parasitol* **2009**, *95*, 1239–1242, doi:10.1645/GE-2052.1. 630
631
67. King, B.J.; Keegan, A.R.; Moris, P.T.; Saint, C.P. Environmental Temperature Controls *Cryptosporidium* Oocyst Metabolic Rate and Associated Retention of Infectivity. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*, 3848–3857, doi:10.1128/AEM.71.7.3848-3857.2005. 632
633
634
68. Pickup, Z.L.; Pickup, R.; Parry, J.D. Growth of *Acanthamoeba Castellanii* and *Hartmannella Vermiformis* on Live, Heat-Killed and DTAF-Stained Bacterial Prey. *FEMS Microbiol Ecol* **2007**, *61*, 264–272, doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00346.x. 635
636
637
638

2 Résultats complémentaires

2.1 En condition planctonique

2.1.1 Interactions entre *V. vermiformis* et *C. parvum*

Il a été observé une faible diminution de la concentration de *V. vermiformis* ($< 0,5 \log_{10}$) au cours du temps, avec et sans présence concomitante d'oocystes de *C. parvum* (Figure 31). La concentration de *V. vermiformis* passait de $5,53 \pm 0,14 \log_{10}$ à J0 à $5,01 \pm 0,14 \log_{10}$ à J28 (p -value $< 0,001$) (en présence d'oocystes de *C. parvum*) et de $5,59 \pm 0,11 \log_{10}$ à J0 à $5,24 \pm 0,11 \log_{10}$ à J28 (p -value $< 0,001$) (en l'absence d'oocystes).

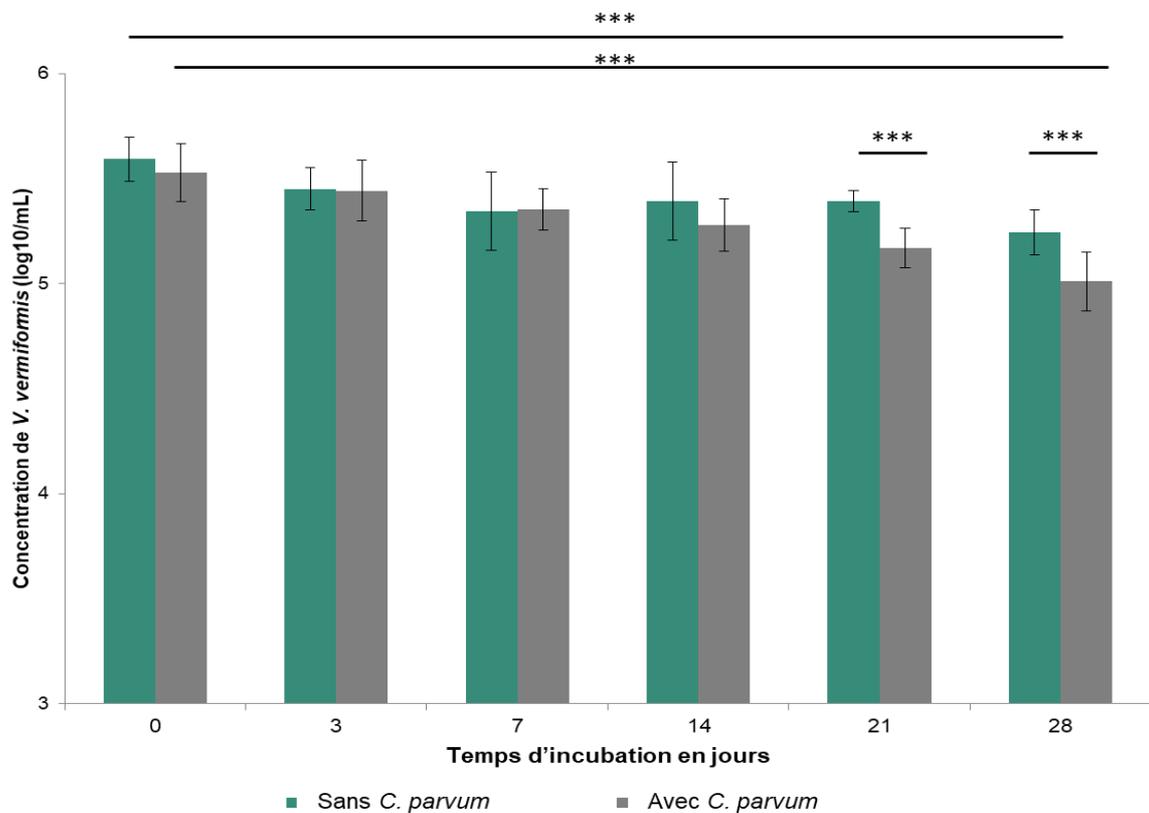


Figure 31 : Dénombrement de *V. vermiformis* en co-incubation avec de oocystes de *C. parvum* selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique (grossissement x 200).
 p -value : *** $< 0,001$, ** $< 0,01$. N = 3.

Concernant l'enkystement de *V. vermiformis* (figure 32), il a été observé une augmentation significative de l'enkystement au cours du temps. En présence d'oocystes, la proportion de kystes est passée de 4,53% ± 0,58% à J0 à 14,92% ± 2,92% à J28 ($p\text{-value} < 0,001$) et en absence d'oocyste de 5,4% ± 0,98% à J0 à 9,78% ± 1,86% à J28 ($p\text{-value} < 0,001$). La présence d'oocyste ne semble pas modifier significativement l'enkystement de *V. vermiformis*. Seul le dernier point de cinétique montre une différence légèrement significative ($p\text{-value} < 0,001$) entre les deux conditions.

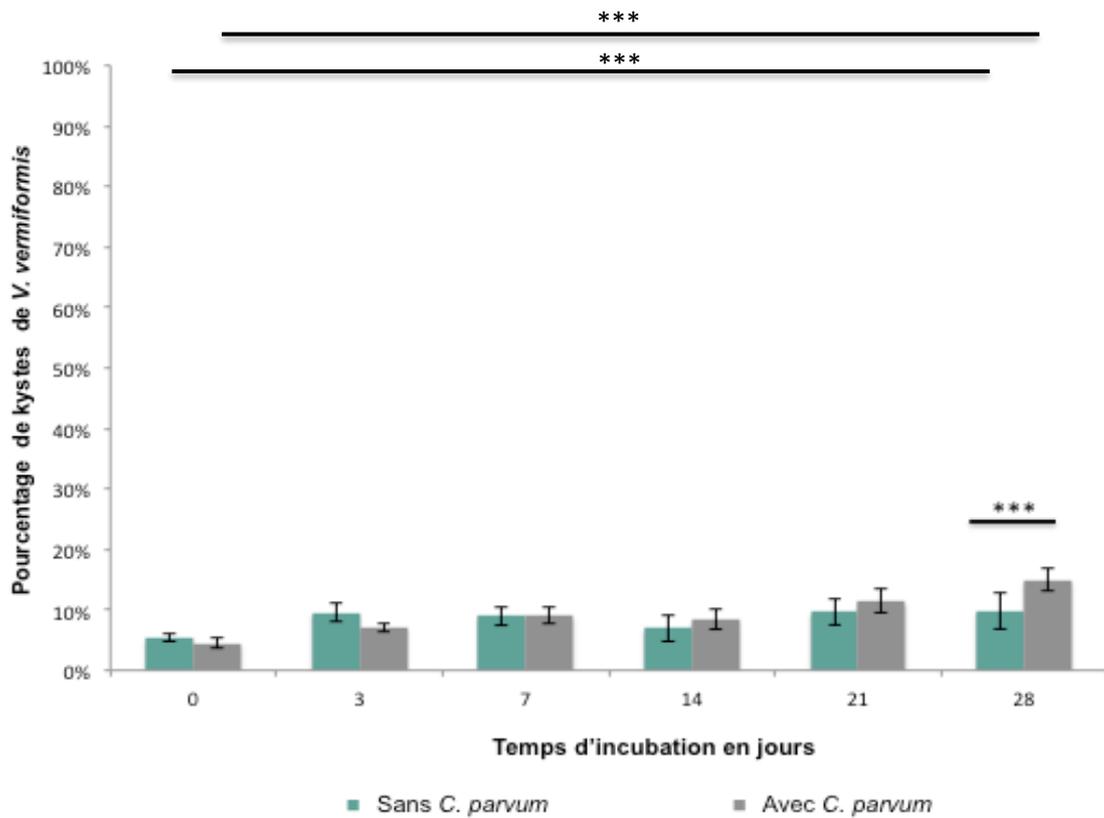


Figure 32: Proportion d'enkystement de *Vermamoeba vermiformis* avec et sans oocystes de *C. parvum* selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique (grossissement x 200).
 $p\text{-value} : *** < 0,001$. N = 3.

L'évolution de la quantité d'oocystes de *C. parvum* en fonction du temps est représentée sur la figure 33. La quantité d'oocystes est restée constante au cours du temps et n'a pas été pas modifiée de manière significative par la présence de *V. vermiformis*.

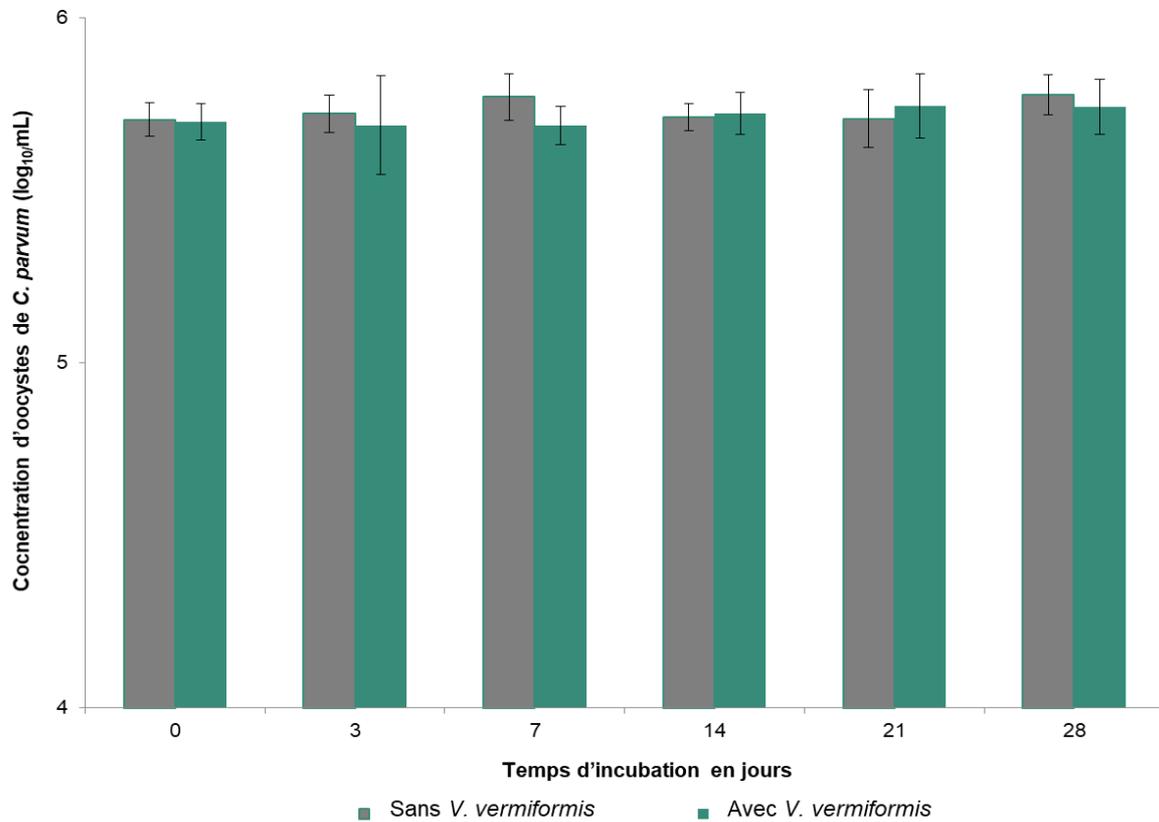


Figure 33 : Dénombrement des oocystes de *C. parvum* en co-incubation avec *V. vermiformis* selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique (grossissement x 400). N = 3.

Enfin, la figure 34 a montré que l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* n'a pas été modifiée de manière significative au cours du temps par la présence de *V. vermiformis*.

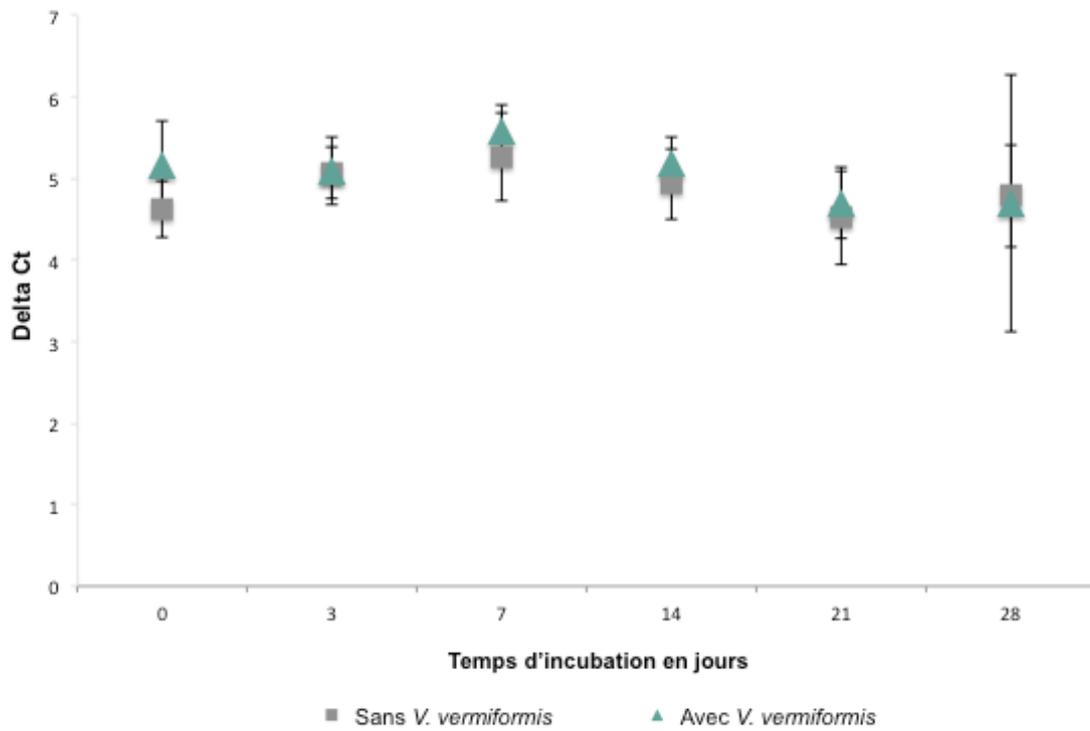


Figure 34: Évaluation de l'infectiosité des oocystes *C. parvum* en présence de *V. vermiformis* selon une cinétique de temps en condition planctonique par CC-qPCR. N = 3.

2.1.2 Interactions entre *A. castellanii* et *C. parvum*

En complément des résultats présentés dans l'article précédent, un dénombrement des oocystes a été réalisé selon la cinétique rapprochée (1h, 3h et 24h) puisque les interactions entre *A. castellanii* et *C. parvum* sont apparues précocement en termes de modification de l'infectiosité des oocystes. Finalement, sur cette période courte d'interactions potentielles, le nombre d'oocystes est resté constant au cours du temps et n'a pas été modifié par la présence d'*A. castellanii* (figure 35).

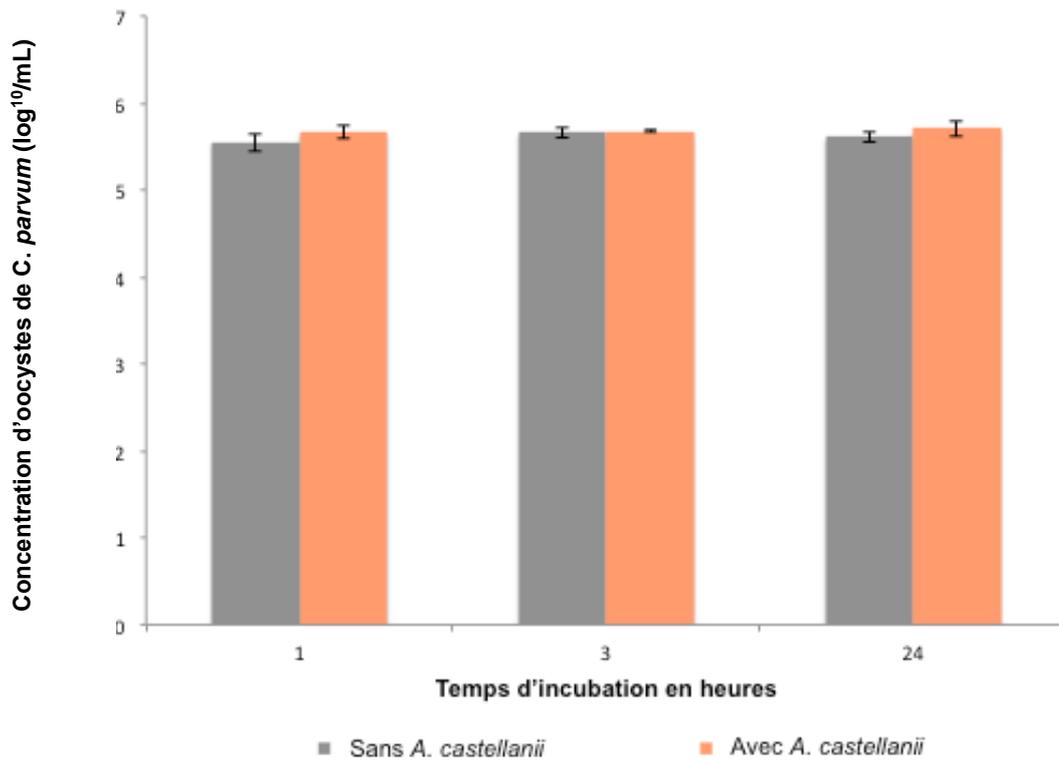


Figure 35: Dénombrement des oocystes de *C. parvum* avec et sans *A. castellanii* selon une cinétique de temps rapprochée en condition planctonique par microscopie optique (grossissement x 400). N = 3.

Afin d'évaluer si la diminution observée de l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* en présence d'*A. castellanii* était due à une interaction physique ou chimique, des inserts ont été utilisés comme décrit dans la section méthode (page 118). Les résultats ont montré que lorsque les oocystes de *C. parvum* n'étaient pas en contact physique avec *A. castellanii*, l'infectiosité des oocystes n'était pas modifiée (Figure 36)

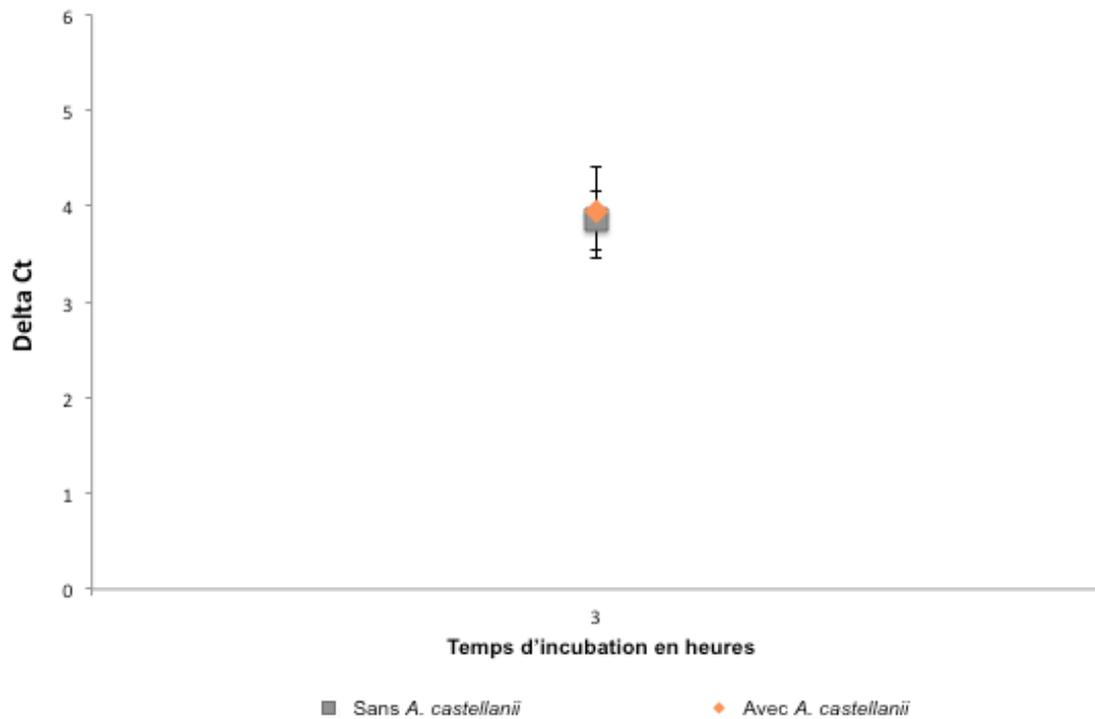


Figure 36 : Infectiosité des oocystes de *C. parvum* après 3 heures de co-incubation avec *A. castellanii* physiquement séparés par un insert par CC-qPCR. N = 3.

2.2 En condition biofilm

2.2.1 Évaluation de la survie de *V. vermiformis* avec et sans *C. parvum*

La quantité de *V. vermiformis* au sein du biofilm a augmenté au cours du temps pour se stabiliser à partir de J1 en l'absence d'oocystes de *C. parvum*. En présence d'oocystes, la quantité de *V. vermiformis* au sein du biofilm était plus importante dès J0 par rapport à la condition sans oocystes (p -value <0.001) et cette quantité d'amibes libres au sein du biofilm est restée stable au cours du temps (Figure 37). En condition planctonique, cette différence n'avait pas été observée. La présence d'oocystes pourrait alors favoriser la sédimentation de *V. vermiformis* ou son intégration précoce dans le biofilm.

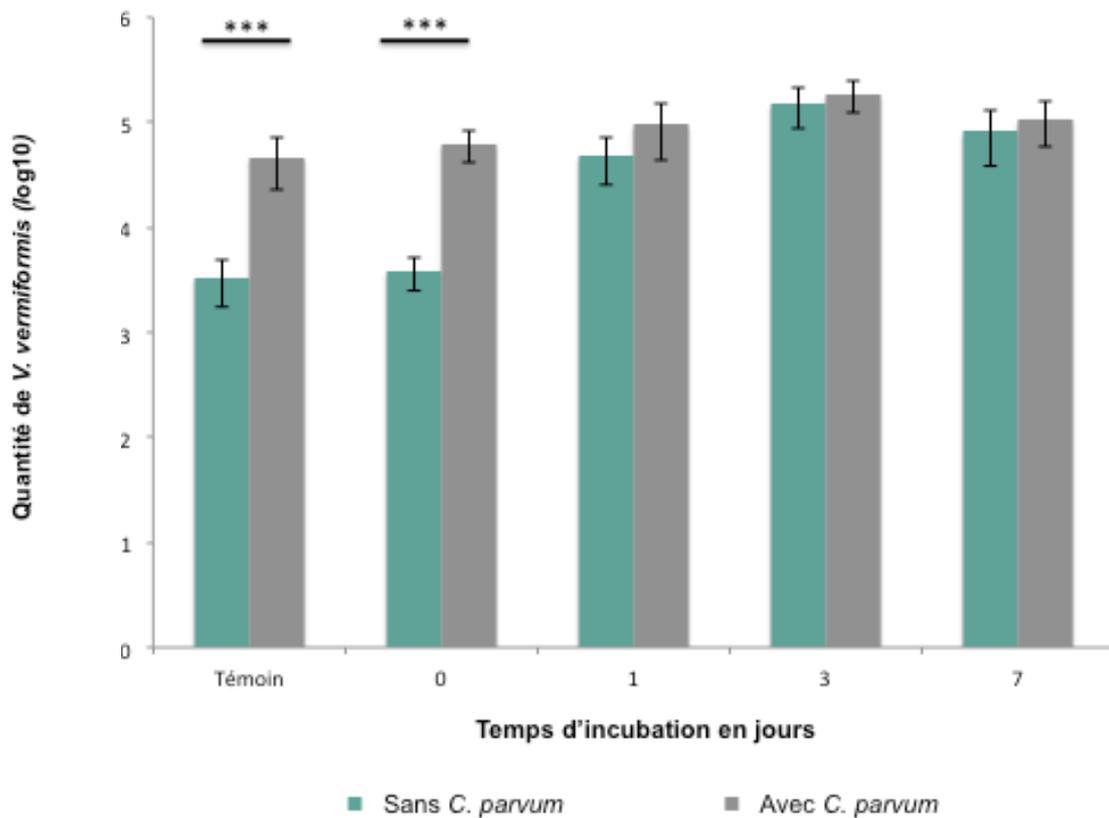


Figure 37: Dénombrement de *V. vermiformis* en co-incubation avec de oocystes de *C. parvum* selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique (grossissement x 200). p -value : *** < 0,001. N= 3. Le Témoin correspond à la quantité d'amibes libres observés dès les premières minutes de temps de contact (< 30 min) et J0 correspond à 3h de temps de contact)

2.2.2 Dénombrement des oocystes de *C. parvum* avec et sans *V. vermiformis*

Dans le biofilm de *P. aeruginosa*, en absence de *V. vermiformis*, la quantité d'oocystes de *C. parvum* a augmenté passant de 5,02 +/- 0,04 log₁₀ à J0 à 5,34 +/- 0,06 log₁₀ à J7 (*p*-value < 0,001). En présence de *V. vermiformis*, la quantité d'oocystes est restée constante au cours du temps (Figure 38). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en présence d'*A. castellanii* en condition biofilm. La condition biofilm pourrait alors entraîner une légère hausse du nombre d'oocystes de *C. parvum* au cours du temps (à confirmer et évaluer sous plusieurs conditions dans des essais ultérieurs).

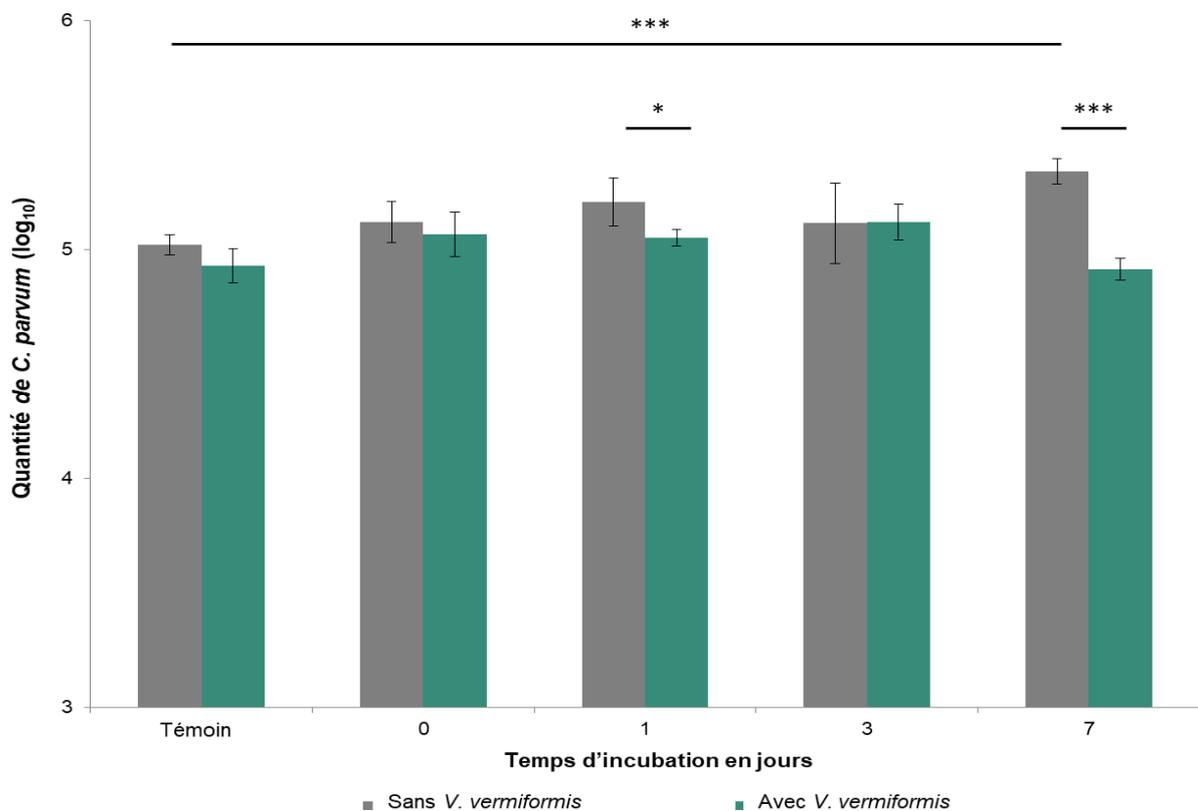


Figure 38 : Dénombrement des oocystes de *C. parvum* en co-incubation avec *V. vermiformis* selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique (grossissement x 400). *p*-value : * < 0,05, *** < 0,001. N = 3. Le Témoin correspond à la quantité d'amibes libres observés dès les premières minutes de temps de contact (< 30 min) et J0 correspond à 3h de temps de contact)

2.2.3 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*

Concernant l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* en condition biofilm en présence d'*A. castellanii*, les résultats sont similaires à la condition planctonique : une diminution significative et transitoire de l'infectiosité a été observée en quelques heures d'interactions (Figure 39).

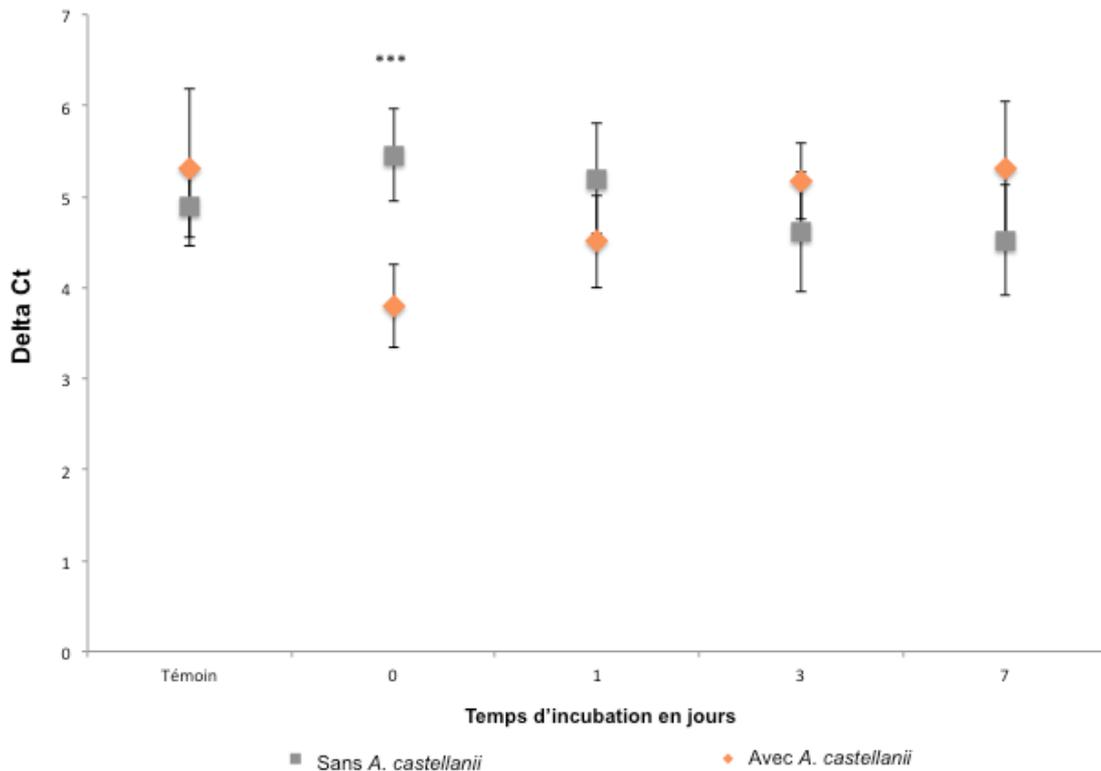


Figure 39 : Évaluation de l'infectiosité des oocystes *C. parvum* en présence d'*A. castellanii* selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR.
p-value : *** < 0,001. N = 3. Le Témoin correspond à la quantité d'amibes libres observés dès les premières minutes de temps de contact (< 30 min) et J0 correspond à 3h de temps de contact)

Concernant l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* en présence de *Vermamoeba vermiformis* en condition biofilm, aucune modification significative de l'infectiosité n'a été observée (Figure 40).

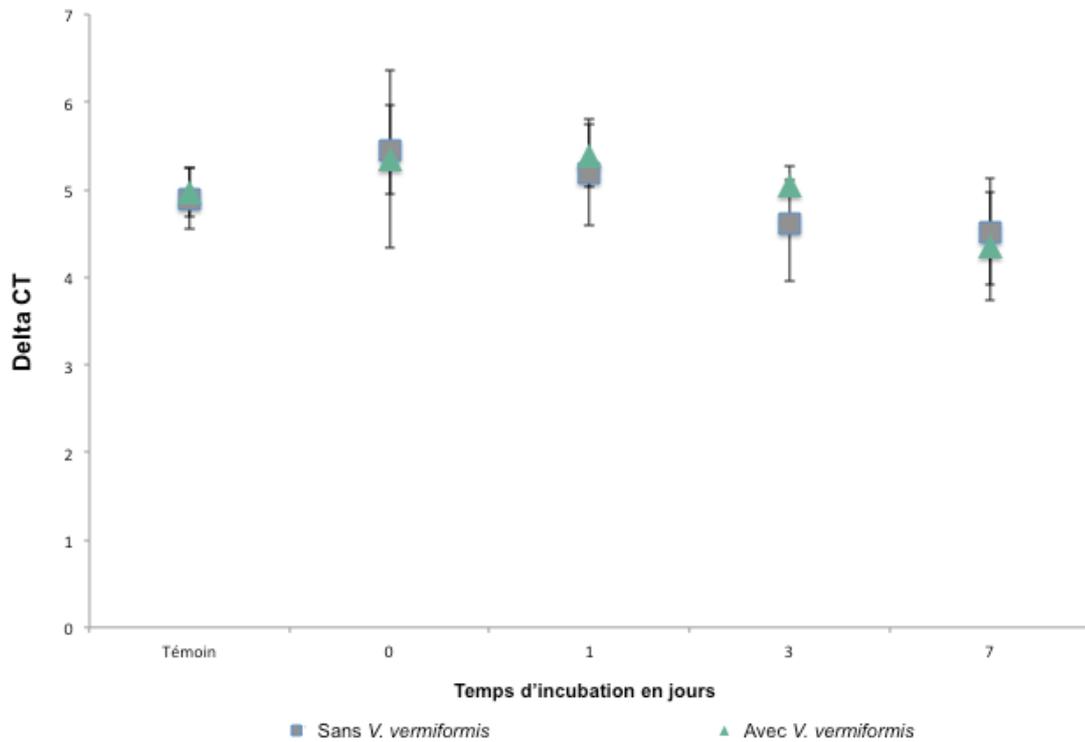


Figure 40 : Évaluation de l'infectiosité des oocystes *C. parvum* en présence de *Vermamoeba vermiformis* selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR. N = 3. Le Témoin correspond à la quantité d'amibes libres observés dès les premières minutes de temps de contact (< 30 min) et J0 correspond à 3h de temps de contact)

2.2.4 Microscopie confocale

Pour *V. vermiformis*, après une heure de contact en condition biofilm, il a été observé des regroupements d'oocystes et des localisations occasionnelles de ces oocystes à l'intérieur des trophozoïtes.

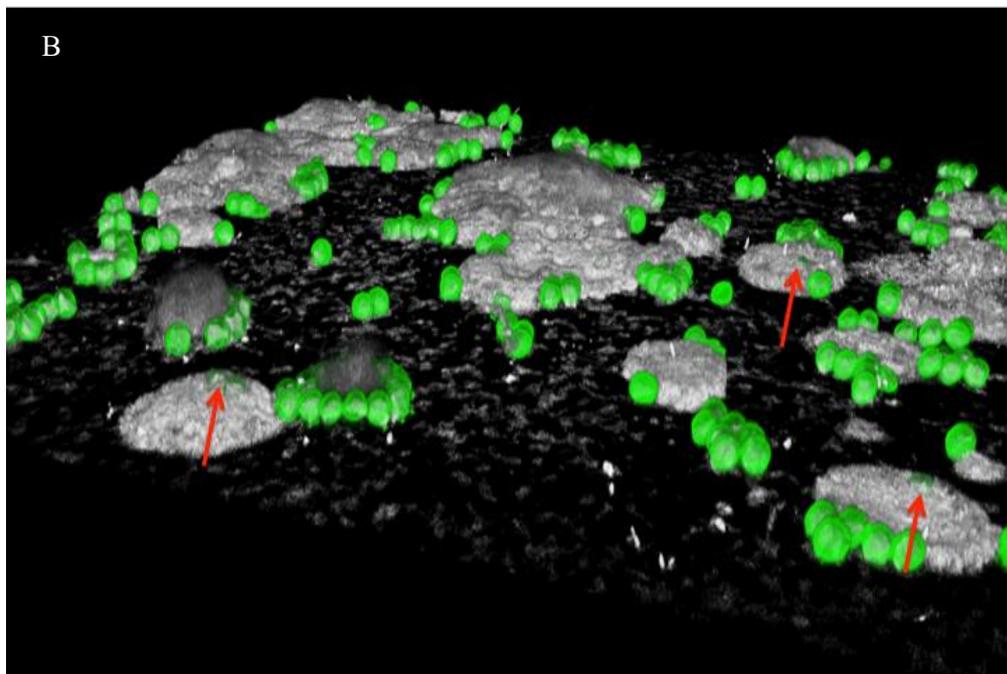
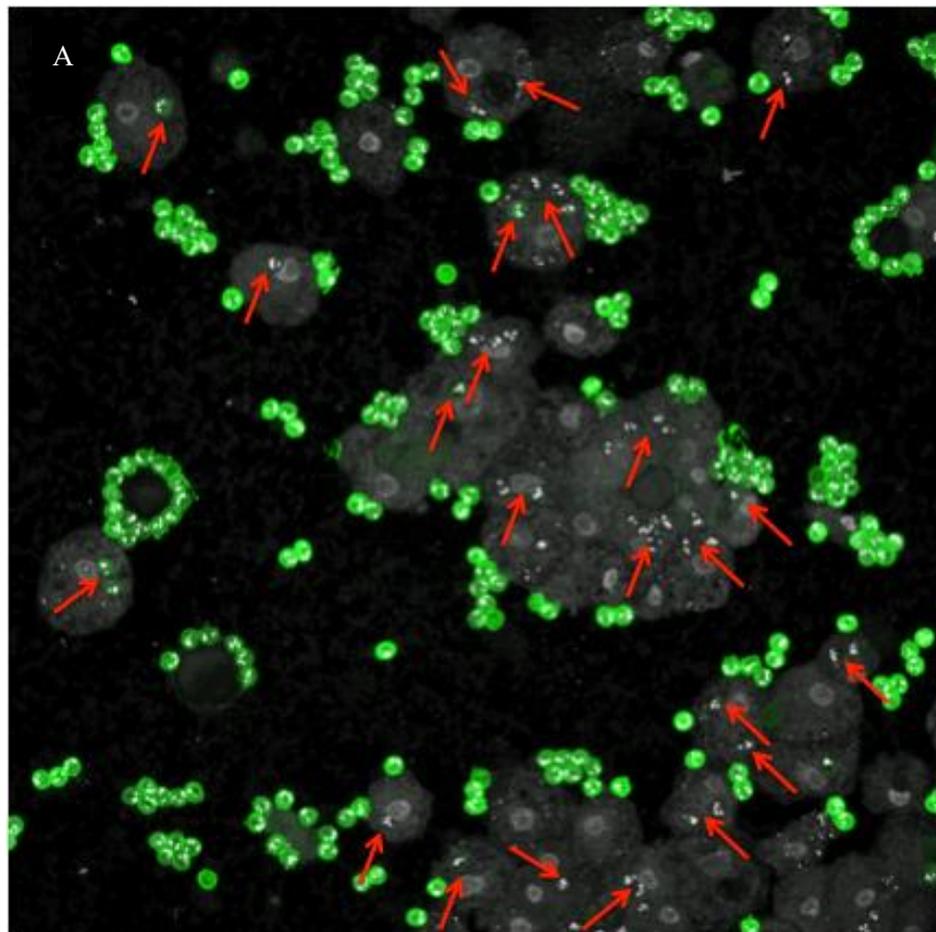


Figure 41 : (A) oocystes de *C. parvum* (vert) et *V. vermiformis* (gris) observés après 1h de co-incubation dans un biofilm de *P. aeruginosa* en microscopie confocale. Les flèches montrent l'inclusion des oocystes à l'intérieur de *V. vermiformis*.

2.2.5 Synthèse des résultats en condition planctonique et biofilm

Une synthèse des résultats obtenus est présentée dans le tableau XIX pour l'effet sur les amibes libres et dans le tableau XX pour l'effet sur les oocystes de *C. parvum*.

Tableau XIX: Synthèse des interactions entre les oocystes de *C. parvum* et le comportement d'*A. castellanii* ou de *V. vermiformis* au cours du temps.

		<i>A. castellanii</i>		<i>V. vermiformis</i>	
		Planctonique	Biofilm	Planctonique	Biofilm
Concentration	Sans oocystes	Diminution progressive	Diminution progressive	Diminution progressive	Augmentation
	Avec oocystes		Constante		Constante
Enkystement	Sans oocystes	Augmentation progressive			
	Avec oocystes				

Tableau XX : Synthèse des interactions entre les oocystes de *C. parvum* et *A. castellanii* ou *V. vermiformis* sur la concentration et l'infectiosité des oocystes au cours du temps.

		Oocystes de <i>C. parvum</i>	
		Planctonique	Biofilm
Concentration	Sans amibes libres	Constante	Augmentation progressive
	Avec <i>A. castellanii</i>		Constante
	Avec <i>V. vermiformis</i>		
Infectiosité	Avec <i>A. castellanii</i>	Diminution précoce et temporaire	
	Avec <i>V. vermiformis</i>	Pas de modification	

En résumé, les interactions entre oocystes et amibes libres dépendent à la fois des microorganismes en présence et de la condition biofilm ou planctonique. La condition biofilm pourrait favoriser la persistance voire même la prolifération des oocystes au cours du temps. Cependant, en présence amibienne cette tendance n'est plus observée au sein du biofilm. Puisque la présence amibienne ne semble pas modifier directement la concentration des oocystes, l'effet serait indirect via interaction des amibes libres avec les bactéries servant de support au biofilm (ici *P. aeruginosa*).

Les résultats ont également démontré que l'infectiosité des oocystes était perturbée transitoirement par la présence de certaines souches amibiennes.

2.2.6 Évaluation de la phagocytose amibienne

Afin d'observer la potentielle phagocytose amibienne des oocystes, des approches en microscopie confocale ont été réalisées. Les figures 42 et 43 montrent les co-incubation entre *C. parvum* et *A. castellanii* (Figure 42) ou *V. vermiformis* (Figure 43) (gris) en condition de biofilm (à *P. aeruginosa*). Les figures 44 et 45 constituent la condition témoin.

Ces figures permettent d'observer la formation d'amas d'oocystes autour des amibes que ce soit après 1h ou 3h de temps de contact ainsi que la présence occasionnelle d'oocystes à l'intérieur des amibes libres. Il est intéressant de noter que les regroupements d'oocystes de *C. parvum* sont observés en condition biofilm même sans présence amibienne (Figures 44C et 45C).

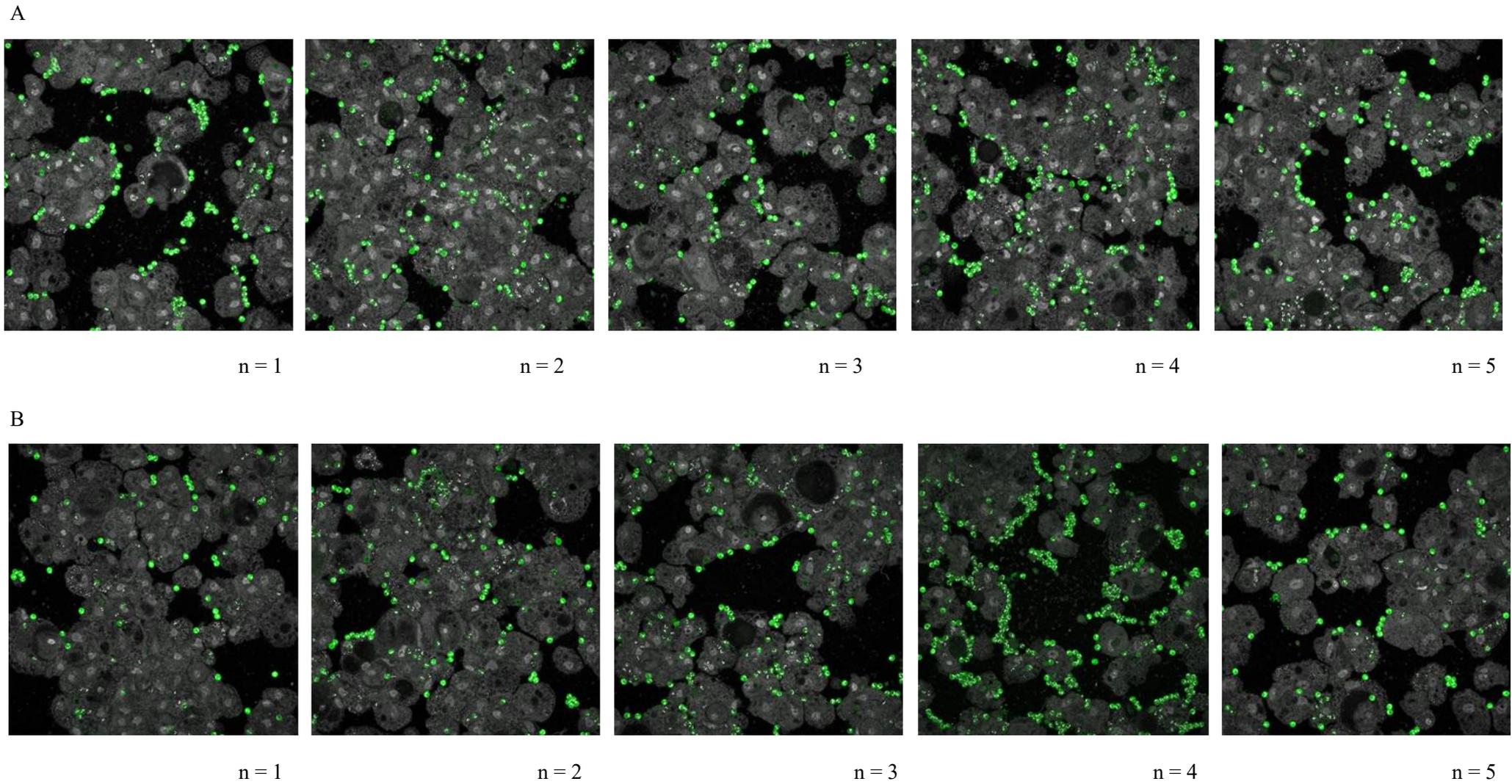


Figure 42 : Observation en n=5 d'oocystes de *C. parvum* (vert par marquage au Cryptocell®) et de trophozoites d'*A. castellanii* (gris par marquage du matériel génétique au DAPI et traitement informatique) après 1 (A) et 3 heures (B) de co-incubation dans un biofilm de *P. aeruginosa* en microscopie confocale. (n représente les répliqués)

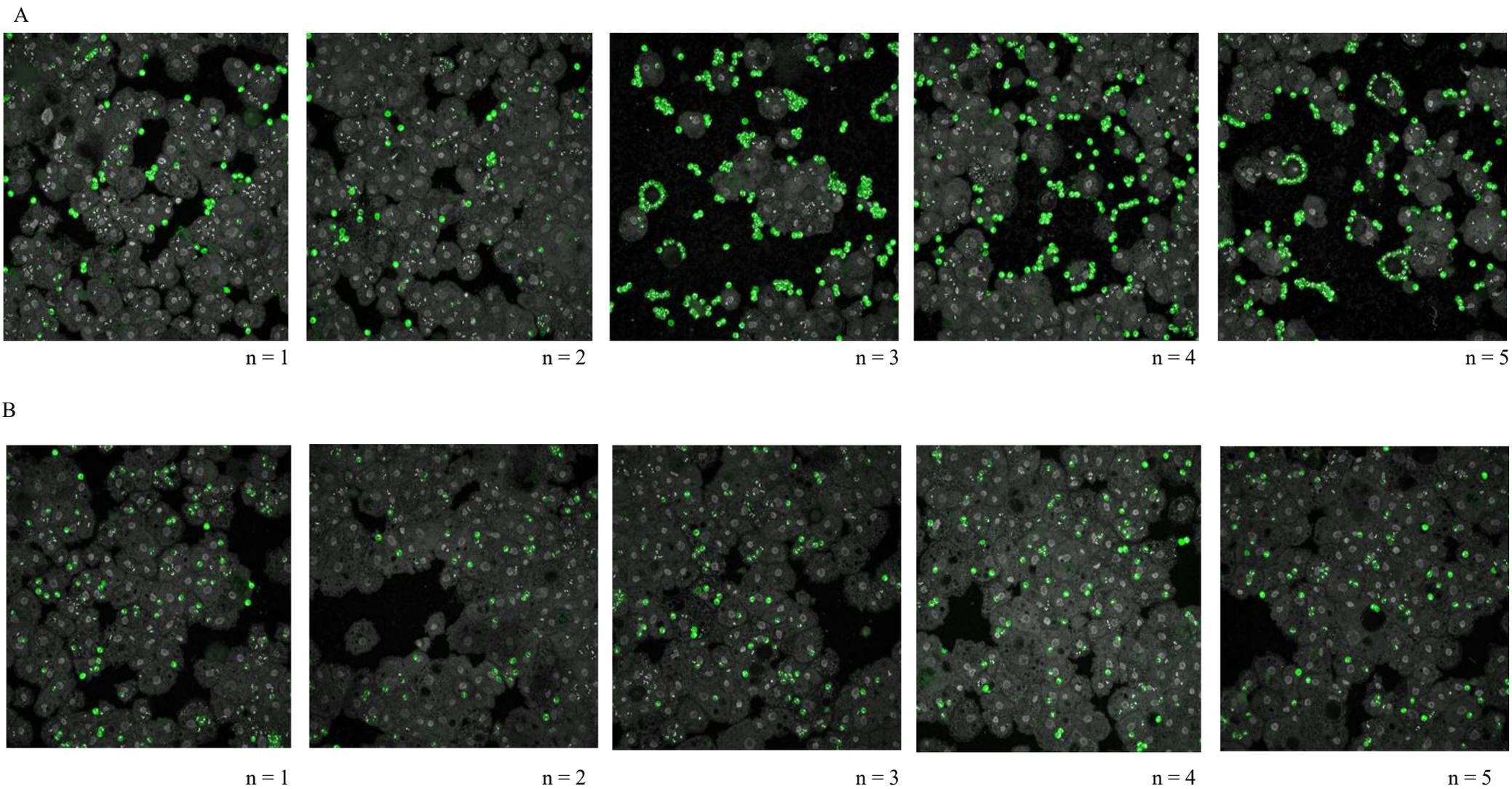


Figure 43 : Observation en n=5 d'oocystes de *C. parvum* (vert par marquage au Cryptocell®) et de trophozoites de *V. vermiformis* (gris par marquage du matériel génétique au DAPI et traitement informatique) après 1 (A) et 3 heures (B) de co-incubation dans un biofilm de *P. aeruginosa* en microscopie confocale. (n représente les répliqués)

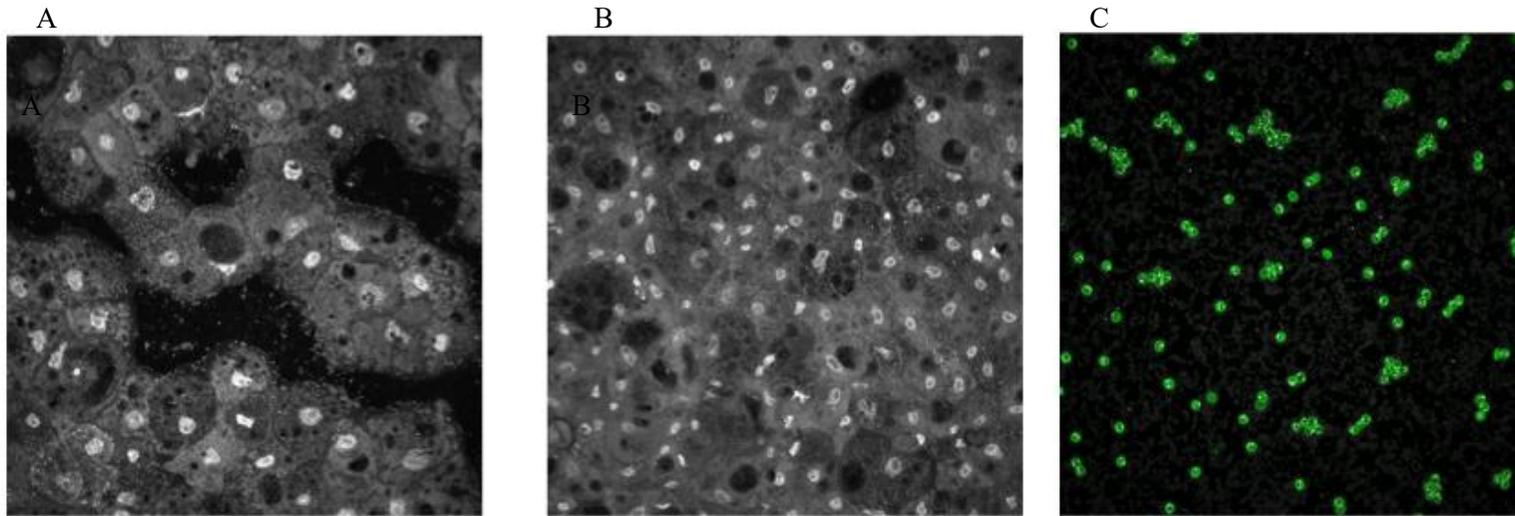


Figure 44 : Observation d'*A. castellanii* (A), de *V. vermiformis* (B) et d'oocystes de *C. parvum* après 1 heure d'incubation dans un biofilm de *P. aeruginosa* en microscopie confocale.

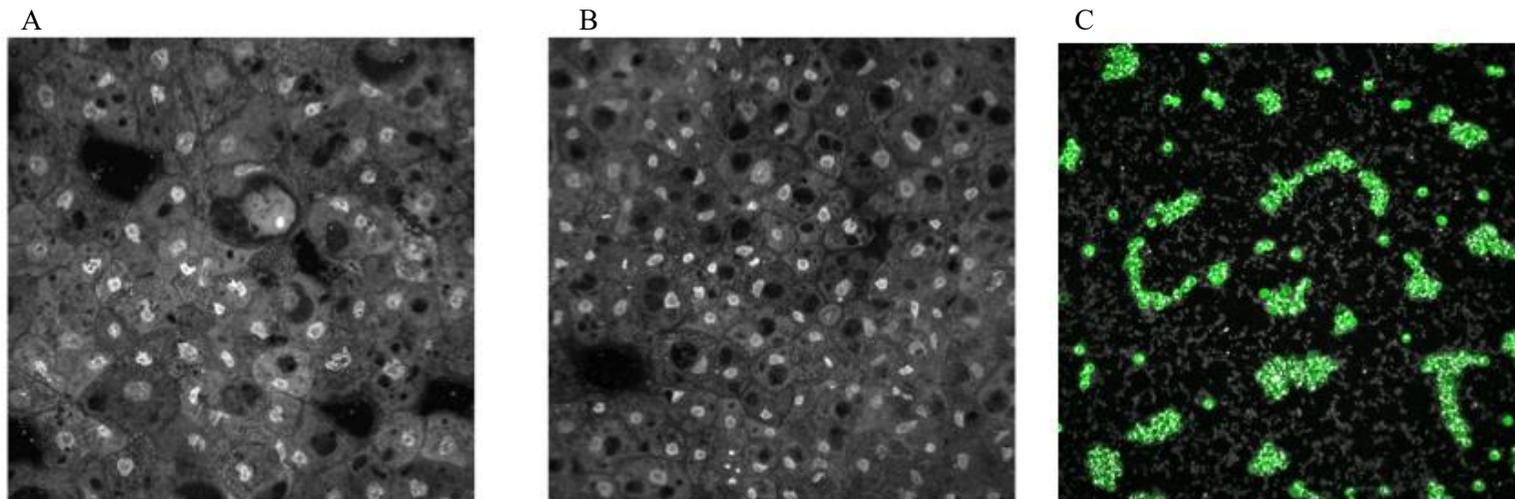


Figure 45 : Observation d'*A. castellanii* (A), de *V. vermiformis* (B) et d'oocystes de *C. parvum* (C) après 3 heures d'incubation dans un biofilm de *P. aeruginosa* en microscopie confocale.

2.3 Résultats additionnels : découverte de mécanismes d'échanges inter-amibiens

Lors de la réalisation d'une vidéo permettant de visualiser les interactions entre *A. castellanii* et *C. parvum*, il a été observé la formation de Tunneling nanotubes (Tnts) entre trophozoites amibiens (figure 46). Les Tnts ont été décrits pour la première fois en 2004 comme un moyen de communication à longue distance entre cellules. Ce sont des structures membranaires tubulaires de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre qui contiennent de l'actine. Les Tnts ont principalement été décrits entre différents types de cellules humaines et permettent l'échange de petites molécules, de protéines, de vésicules et d'organites (Han and Wang, 2021). Il a notamment été montré que les Tnts jouaient un rôle dans la propagation intercellulaire de protéines impliquées dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ou encore dans la résistance du cancer aux traitements. En microbiologie, les Tnts ont essentiellement été décrits entre des bactéries de manière intra et même inter espèces (Dubey *et al.* 2011) mais pour les amibes libres ces Tnts n'ont pas encore été décrits dans la littérature à notre connaissance.

Des études complémentaires ont été menées par la plateforme d'imagerie Primacen afin de visualiser plus en détails la structure des Tnts et deux marqueurs ont permis la visualisation des Tnts : Alexa Fluor™ 488 Phalloïdine permettant de marquer en vert l'actine et la Tubulin-A594 qui marque en rouge la tubuline confirmant la présence de Tnts 1 et 2 (Figures 47 et 48). Un article est en cours de rédaction en collaboration avec PRIMACEN sur cette découverte.

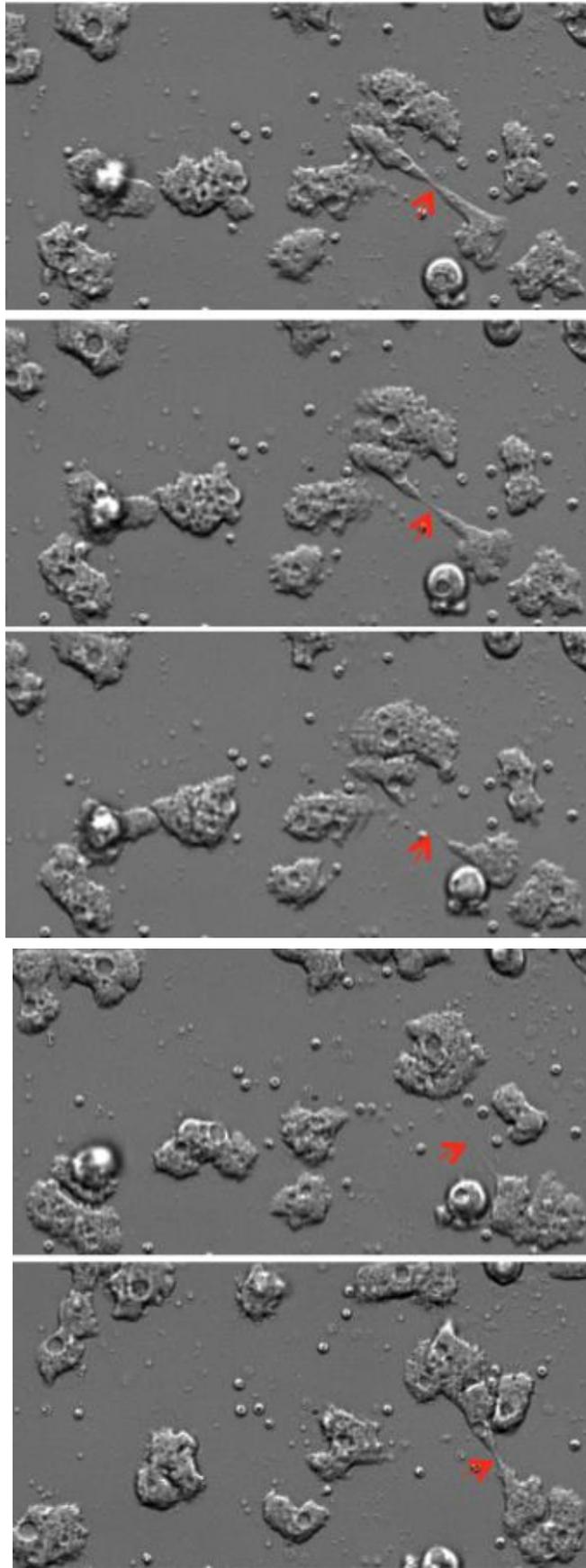


Figure 46: Observation d'*A. castellanii* et d'oocystes de *C. parvum* par video-microscopie. La flèche rouge représente le Tnt formé entre deux trophozoites d'*A. castellanii*

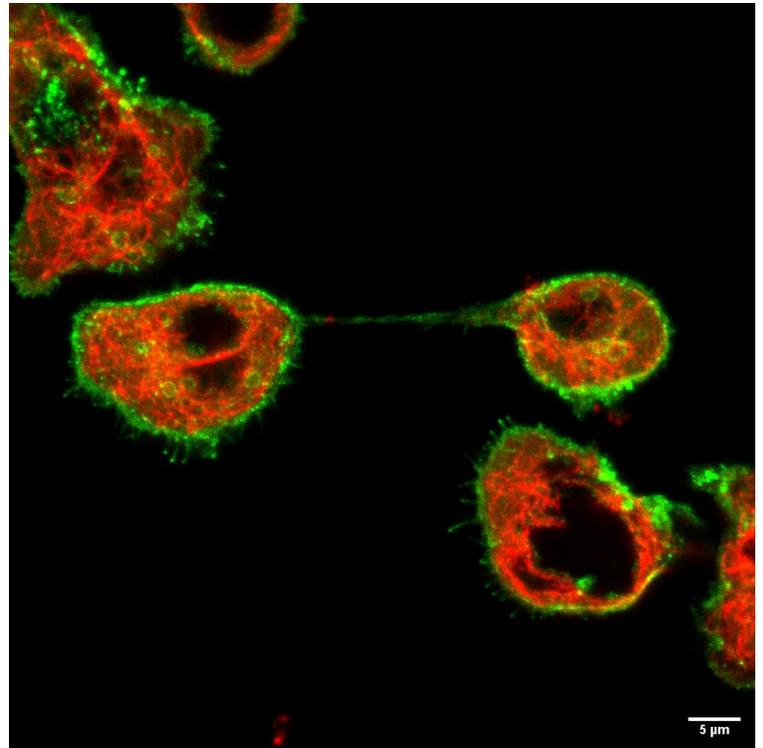
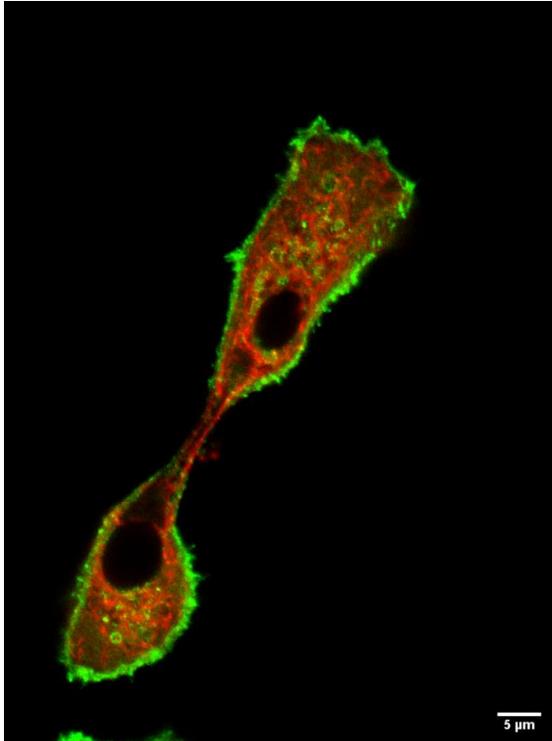


Figure 47 : observation en microscopie confocale de Tnt1 entre deux trophozoites *d'A. castellanii* marqués en vert par Alexa Fluor[™] 488 Phalloïdin et en rouge par la Tubulin-A594

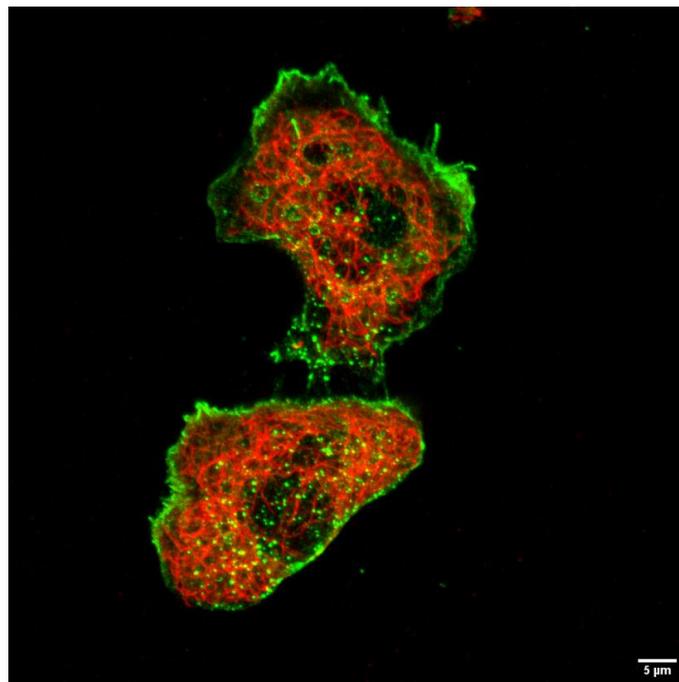


Figure 48: Observation en microscopie confocale de Tnt2 entre deux trophozoites *d'A. castellanii* marqués en vert par Alexa Fluor[™] 488 Phalloïdin et en rouge par la Tubulin-A594

Étude des interactions entre *C. hominis* et amibes libres en conditions planctonique et de biofilm

1 Résultats

1.1 Adaptation de la méthode d'évaluation de l'infectiosité *in vitro*

Tout comme les travaux de Kubina *et al.* ont permis d'optimiser la méthode de CC-qPCR pour *C. parvum* (Kubina *et al.*, 2021), des optimisations ont été nécessaires pour *C. hominis*.

D'après la littérature, avant de réaliser une infection en culture cellulaire, un traitement des oocystes de *C. parvum* à l'acide taurocholique était couramment réalisé (Cook *et al.*, 2006; Fayer, 1995; Gargala *et al.*, 2000; Pecková *et al.*, 2016). L'acide taurocholique favorisant le dékystement des oocystes et donc l'infection cellulaire. Cependant, Kubina *et al.* a montré que l'acide taurocholique n'était finalement pas optimal pour mesurer l'infectiosité de *C. parvum in vitro* (Kubina *et al.*, 2021). Afin de vérifier si un tel traitement était nécessaire pour *C. hominis*, des oocystes ont été incubés avec et sans acide taurocholique 1,5% avant infection des cellules et différentes conditions ont été testées. Deux types cellulaires ont été infectés, les cellules HCT-8 et les cellules Caco-2, qui ont au préalable été cultivées dans différents diamètres de puits (24 et 96 puits), différents temps d'incubation ont également été testés (48 et 72 h) et enfin, différentes concentrations en oocystes ont été utilisées pour infecter les cellules (10^3 et 10^4 / puits) (Figure 49).

Finalement, les conditions optimales d'évaluation *in vitro* de l'infectiosité des oocystes de *C. hominis* ont été les suivantes : 1) dékystement des oocystes en acide taurocholique 1.5% à +37°C pendant 30 minutes avant centrifugation à 15 000 G pendant 10 minutes. 2) remise en suspension du culot en milieu de co-culture avant inoculation des cellules HCT-8 (10^3 oocystes/puits) en plaques 24 puits pendant 48 heures. 3) extraction d'ADN au bout de 48 heures de co-culture puis amplification.

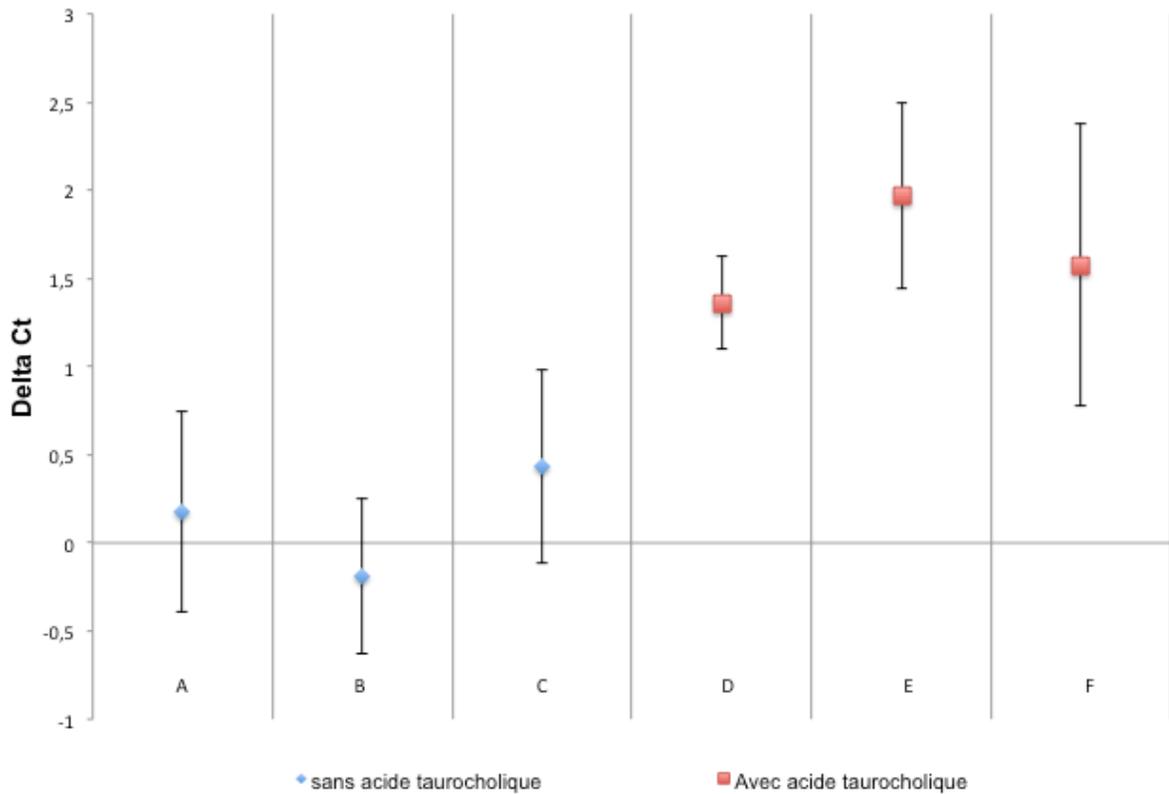


Figure 49 : Évaluation de l’infectiosité des oocystes de *C. hominis* in vitro avec et sans acide taurocholique selon différentes conditions.

A) infection de cellules Caco-2 dans une plaque 96 puits pendant 48h avec une concentration d’oocystes de *C. hominis* de 10^3 /puits. B) infection de cellules HCT-8 dans une plaque 24 puits pendant 72h à la concentration de 10^4 oocystes/puits. C) infection de cellules HCT-8 dans une plaque 24 puits pendant 48h à la concentration de 10^3 oocystes/puits. D) infection de cellules HCT-8 dans une plaque 96 puits pendant 48h à la concentration de 10^3 oocystes/puits. E) infection de cellules HCT-8 dans une plaque 24 puits pendant 48h à la concentration de 10^3 oocystes/puits. F) infection de cellules HCT-8 dans une plaque 24 puits pendant 48 à la concentration de 10^4 oocystes/puits.

1.2 En condition planctonique

1.2.1 Évaluation de la survie et de l’enkystement des amibes libres

La concentration d'*A. castellanii* a diminué significativement en l'absence d'oocystes passant de 4.89 +/- 0.12 log₁₀ initialement à 4.09 +/- 0.26 log₁₀ à J7 (168 heures) (*p-value* < 0.001) (figure 50) alors qu'en présence d'oocystes la concentration est restée constante au cours du temps.

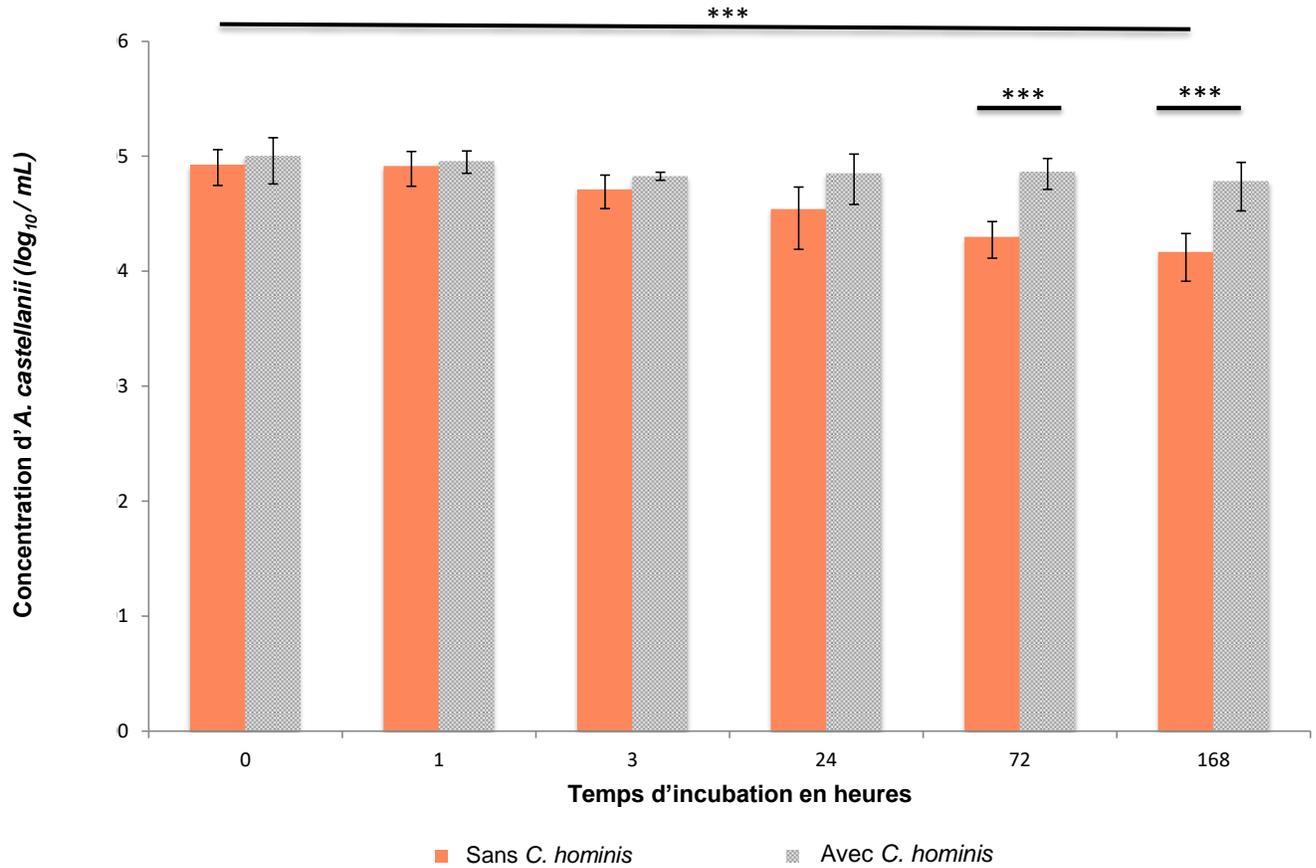
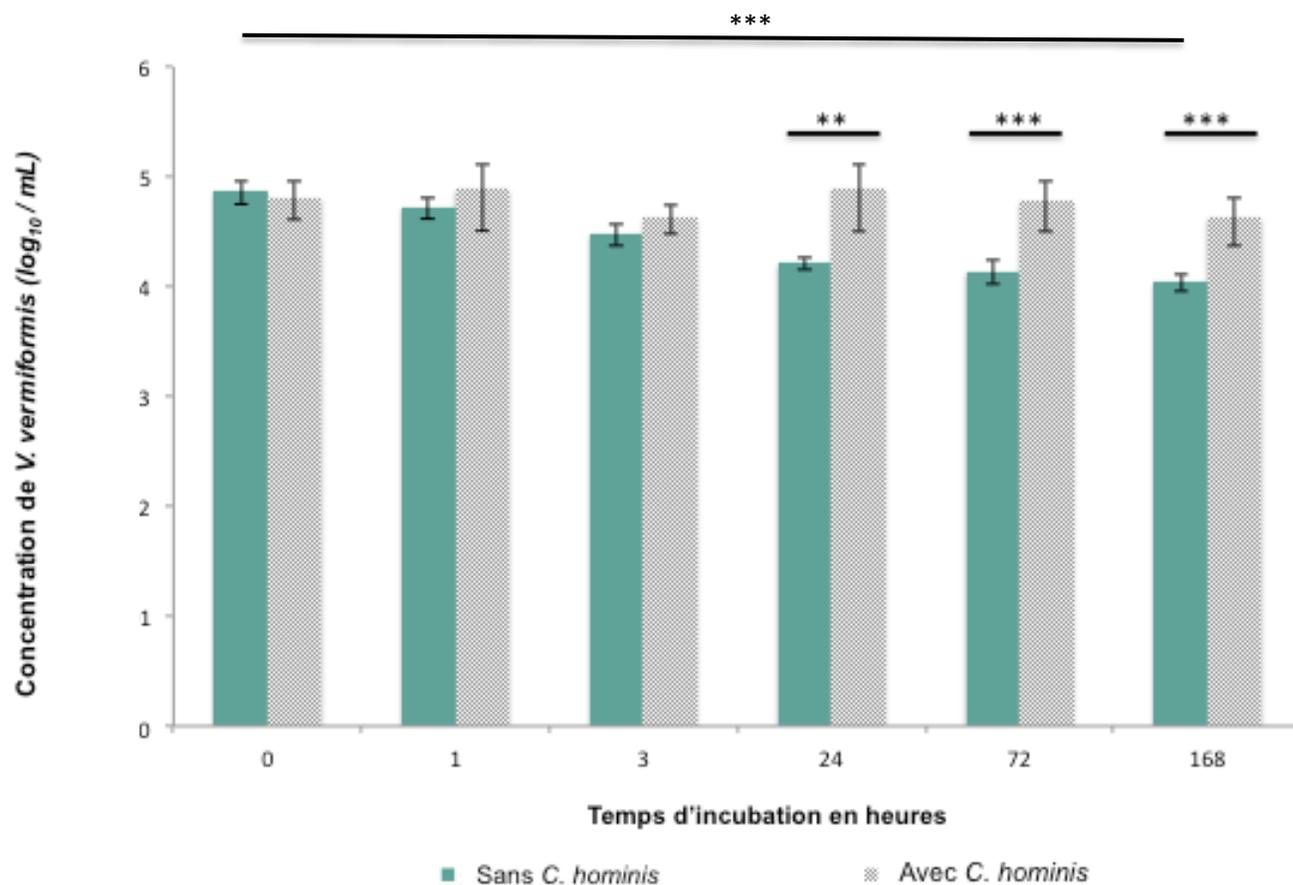


Figure 50: Dénombrement en microscopie optique d'*A. castellanii* avec ou sans oocystes de *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition planctonique (grossissement x 200). *p-value* : * < 0.001. N = 2**

Pour *V. vermiformis*, des résultats similaires ont été observés. En effet, en l'absence d'oocystes, la concentration en *V. vermiformis* a diminué et est passée de 4.84 +/- 0.10 log₁₀ initialement à 4.03 +/- 0.08 log₁₀ à J7 (*p-value* < 0.001) alors qu'en présence d'oocystes la concentration est restée constante au cours du temps (Figure 51).



**Figure 51 : Dénombrement en microscopie optique de *V. vermiformis* avec ou sans oocystes de *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition planctonique (grossissement x 200).
p-value : ** < 0.01 ; *** < 0.001. N =2**

Concernant l'enkystement d'*A. castellanii* et de *V. vermiformis*, il est resté stable au cours du temps qu'ils soient ou non co-incubés avec des oocystes de *C. hominis*. Et la présence d'oocystes n'a pas modifié l'enkystement de ces deux amibes libres (figures 52 et 53).

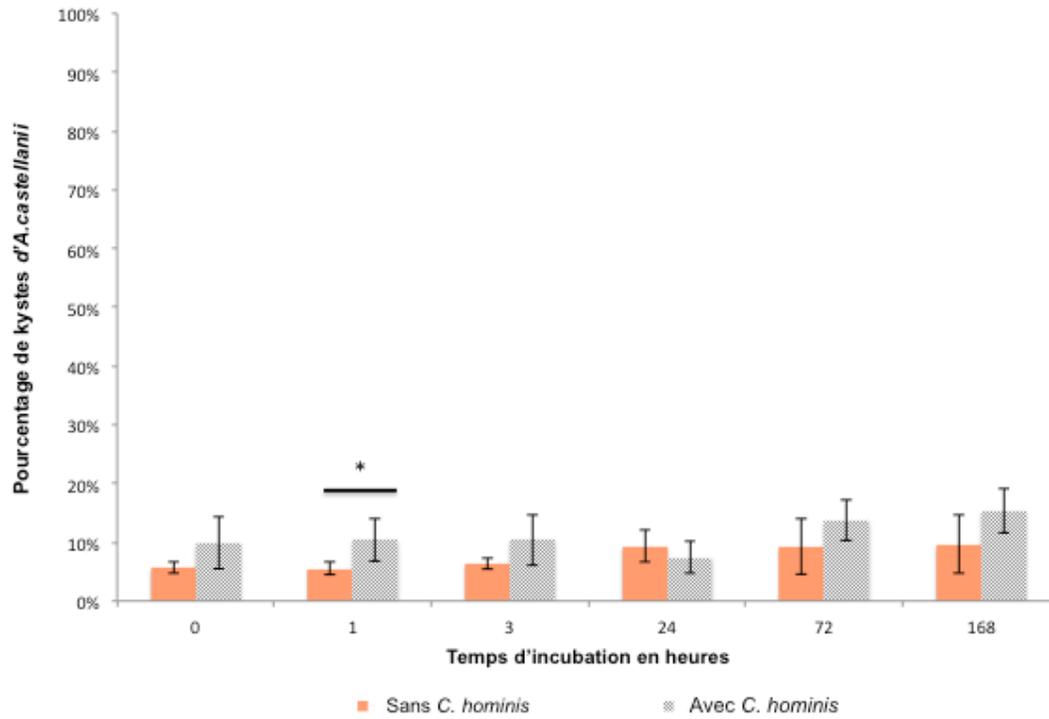


Figure 52 : Dénombrement des kystes d'*A. castellanii* en co-incubation avec *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique (grossissement x 200).
p-value : * < 0.05. N = 2

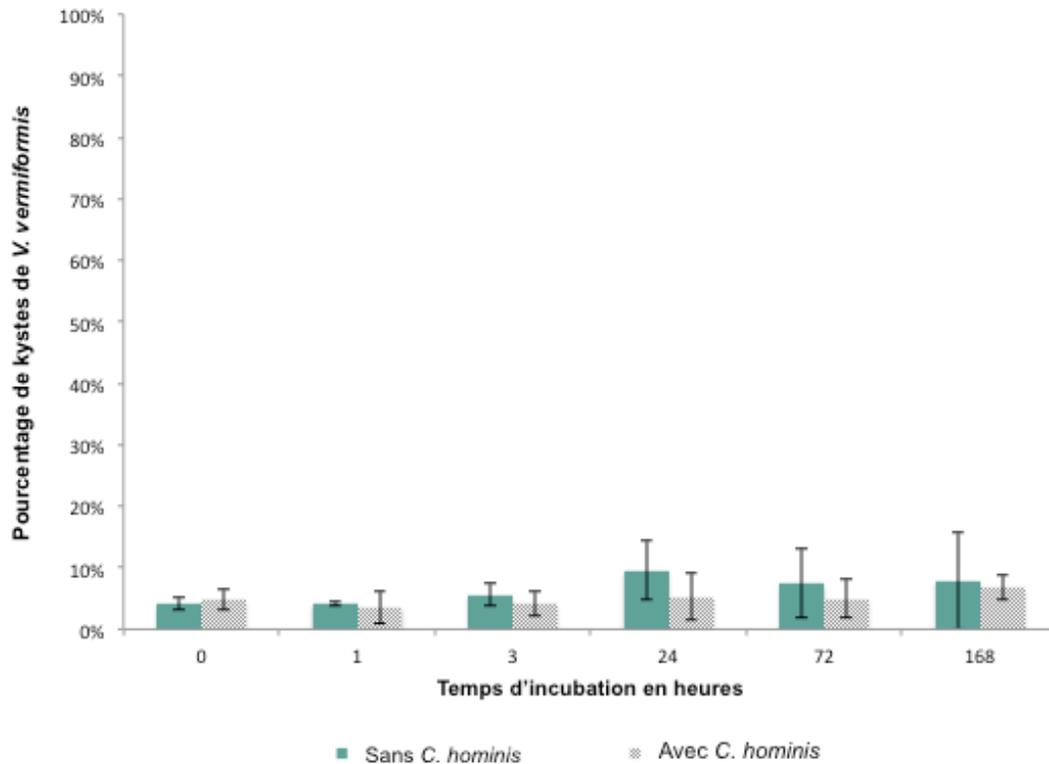


Figure 53 : Dénombrement des kystes de *V. vermiformis* en co-incubation avec *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition planctonique en microscopie optique (grossissement x 200). N = 2

1.2.2 Dénombrement des oocystes de *C. hominis*

La concentration en oocystes est restée constante au cours du temps avec et sans amibes libres.

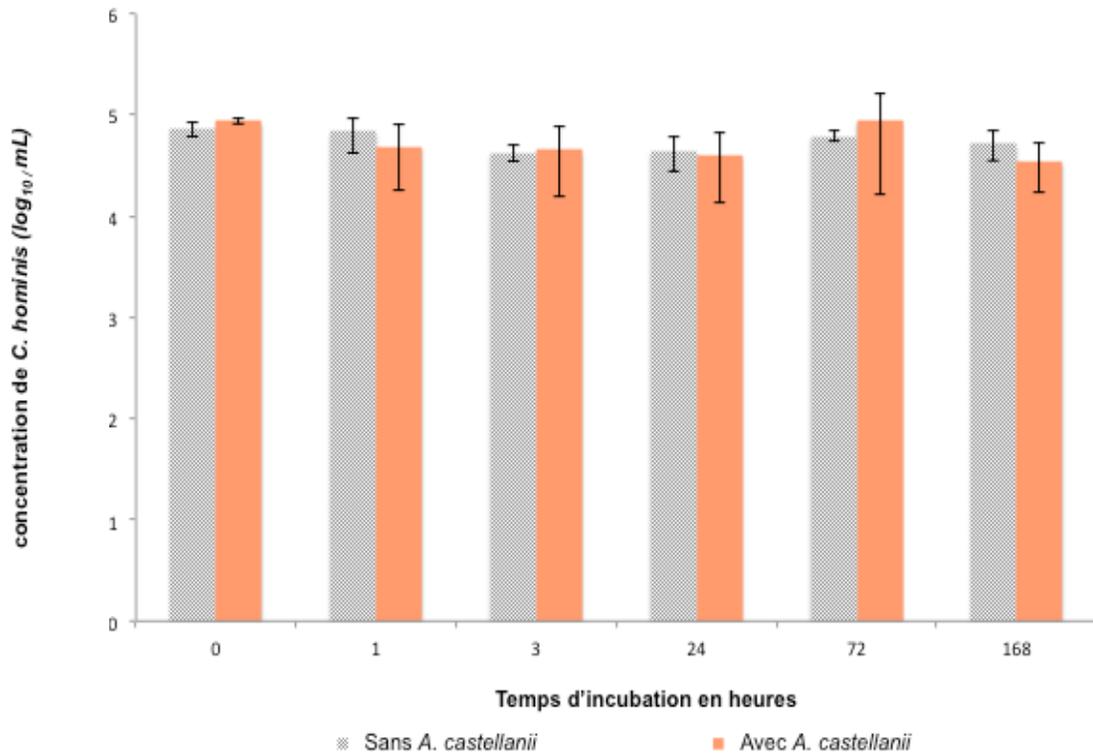
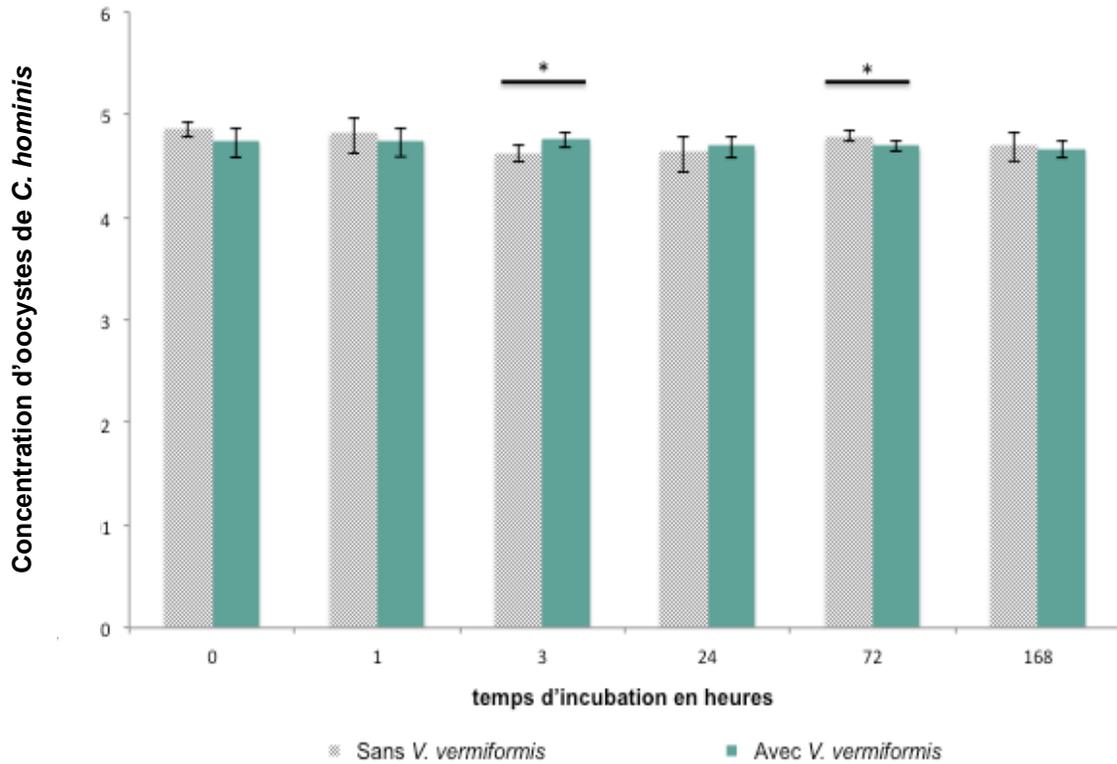


Figure 54 : Dénombrement en microscopie optique des oocystes de *C. hominis* en co-incubation avec *A. castellanii* selon une cinétique de temps en condition planctonique (grossissement x 400). N = 2.



**Figure 55 : Dénombrement en microscopie optique des oocystes de *C. hominis* en co-incubation avec *V. vermiformis* selon une cinétique de temps en condition planctonique (grossissement x 400).
p-value : * < 0.05. N = 2.**

1.2.3 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de *C. hominis*

Aucune modification de l'infectiosité de *C. hominis*, représentée par le Delta Ct, n'a été observée en présence d'*A. castellanii* ou encore de *V. vermiformis* (Figures 56 et 57). On note néanmoins une variabilité plus importante de la méthode que pour les tests avec *C. parvum*.

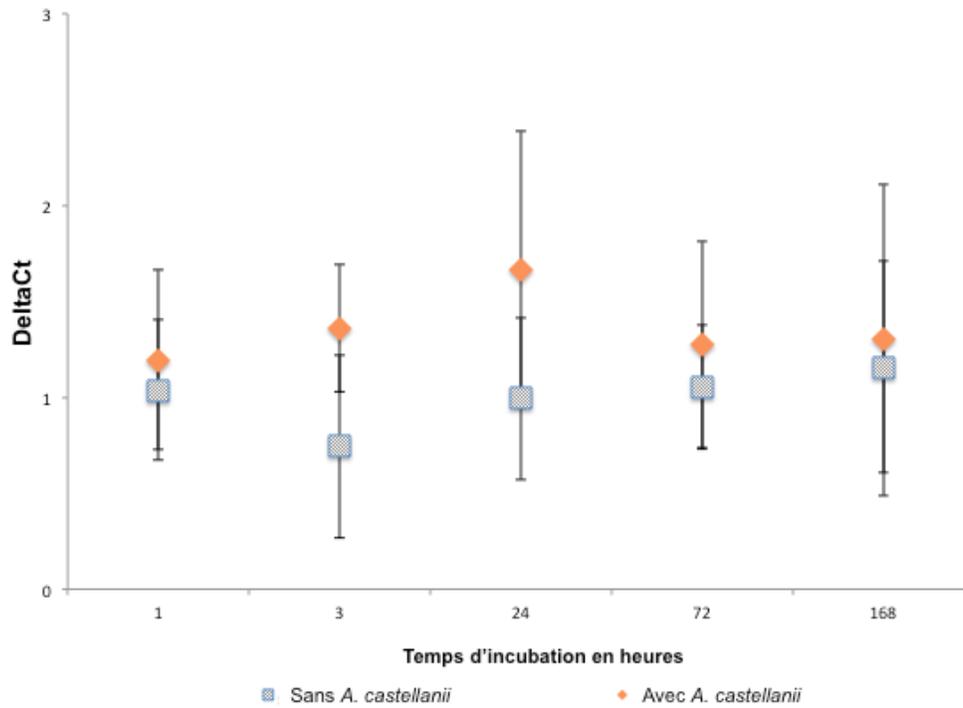


Figure 56 : Évaluation de l'infectiosité des oocystes *C. hominis* en présence d'*A. castellanii* selon une cinétique de temps en condition planctonique par CC-qPCR. N = 2.

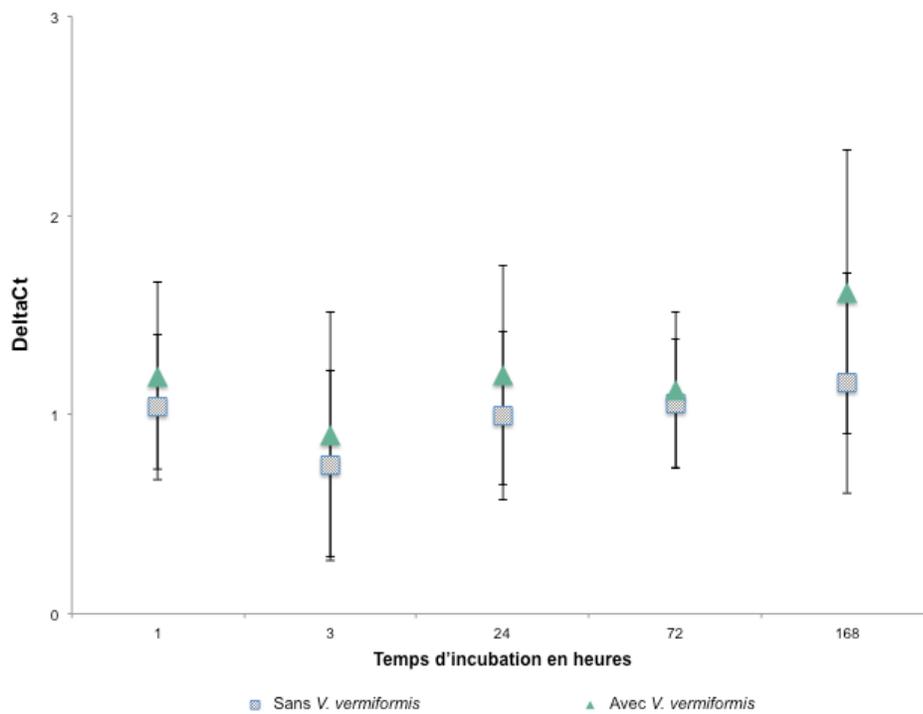


Figure 57 : Évaluation de l'infectiosité des oocystes *C. hominis* en présence de *V. vermiformis* selon une cinétique de temps en condition planctonique par CC-qPCR. N = 2.

1.3 En condition biofilm

1.3.1 Évaluation de la survie et de l'enkystement des amibes libres

En présence ou en l'absence d'ocystes de *C. hominis*, la quantité d'*A. castellanii* a augmenté mais s'est stabilisée après 24h de co-incubation. La quantité est passée de 3,10 +/- 0,46 log₁₀ initialement à 3,85 +/- 0,18 log₁₀ à 24h en l'absence d'ocystes (*p-value* < 0,001) et de 3,56 +/- 0,49 log₁₀ initialement à 4,11 +/- 0,11 log₁₀ à 24h (*p-value* < 0,001) en présence d'ocystes.

Pour chaque point de cinétique, à l'exception d'une heure, la quantité d'amibes libres était significativement plus élevée en présence d'ocystes.

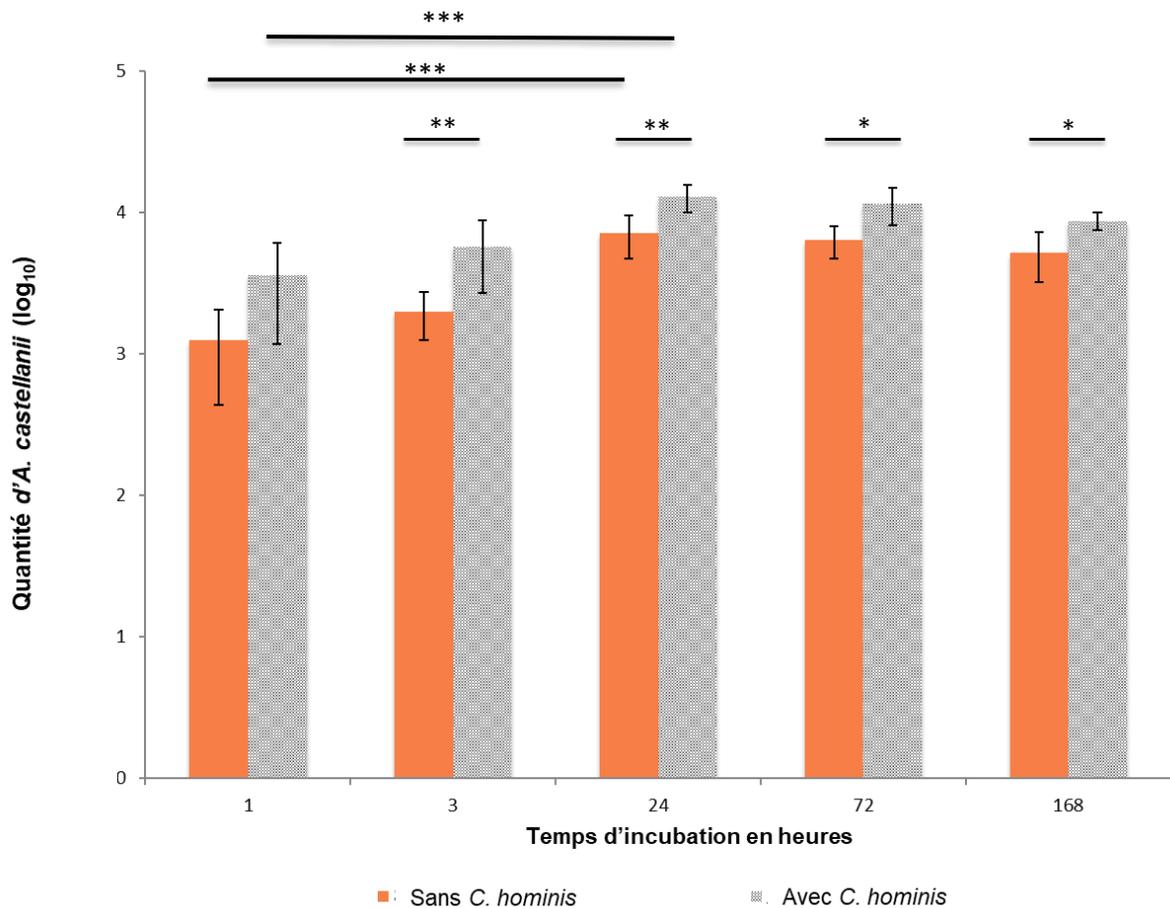


Figure 58 : Dénombrement d'*A. castellanii* en co-incubation avec des ocystes de *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique (grossissement x 200).

p-value : * < 0.05, ** < 0.01. N = 2

Concernant l'évolution de la quantité de *V. vermiformis* au cours du temps, que ce soit en l'absence ou en présence d'oocystes, la quantité a augmenté et s'est stabilisée après 72h d'incubation. La quantité de *V. vermiformis* est passée de 2,88 +/- 0,60 log₁₀ initialement à 4,50 +/- 0,14 log₁₀ à 72h sans oocystes (*p-value* < 0,001) et de 3,78 +/- 0,18 log₁₀ initialement à 4,52 +/- 0,21 log₁₀ à 72h en présence d'oocystes (*p-value* < 0,001).

La quantité d'amibes libres au sein du biofilm était plus élevée en présence d'oocystes pour les 3 premiers points de cinétique en présence d'oocystes. Des résultats similaires ont également été observés en présence de *C. parvum*, la condition avec oocystes pourrait donc favoriser la présence d'amibes libres plus précocement au sein du biofilm.

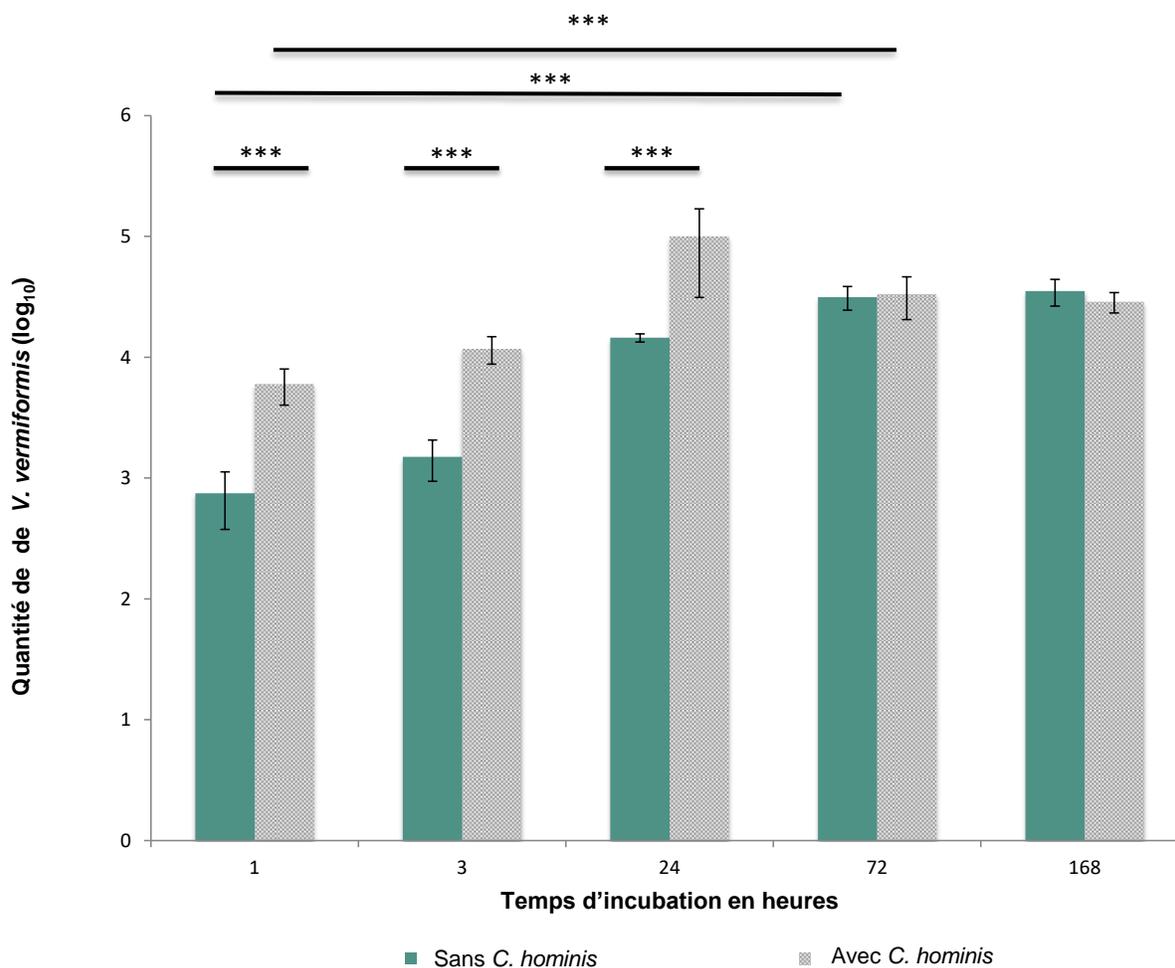
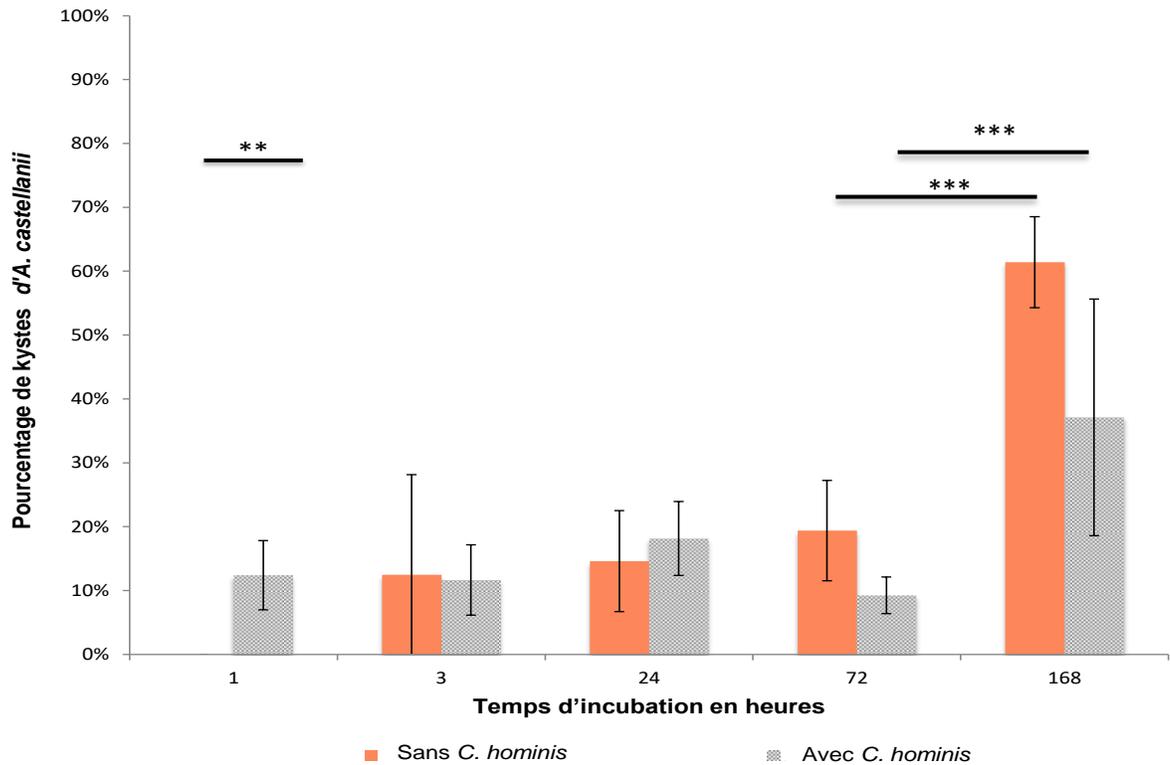


Figure 59 : Dénombrement en microscopie optique de *V. vermiformis* avec et sans oocystes de *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition biofilm (grossissement x 200).

p-value : *** < 0.001. N = 2

Il est intéressant de noter que le pourcentage de kystes d'*A. castellanii*, que ce soit en présence ou en absence d'oocystes, suit la même évolution au cours du temps. En effet le pourcentage de kystes reste stable jusqu'à 72h et augmente ensuite de manière significative. Le pourcentage de kystes est passé de 19.39% +/- 7.85 % à J3 à 61.41% +/- 7.13% à J7 en l'absence d'oocystes ($p\text{-value} < 0,001$) et de 9.25 % +/- 2.85 % à J3 à 37.11 +/- 18.55% à J7 en présence d'oocystes ($p\text{-value} < 0,001$).



**Figure 60 : Dénombrement des kystes d'*A. castellanii* en co-incubation avec *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique (grossissement x 200).
 $p\text{-value} : ** < 0,01$. N = 2**

Comme pour *A. castellanii*, il a été observé une augmentation significative du pourcentage de kystes de *V. vermiformis*, ici après 24h avec et sans oocystes de *C. hominis*. Le pourcentage de kystes est passé de 13.65% +/- 4.88 % à J1 à 71.30% +/- 8.06% à J7 en l'absence d'oocystes ($p\text{-value} < 0,001$) et de 21.11 % +/- 13.20 % à J1 à 81,02 +/- 2,69% à J7 en présence d'oocystes ($p\text{-value} < 0,001$).

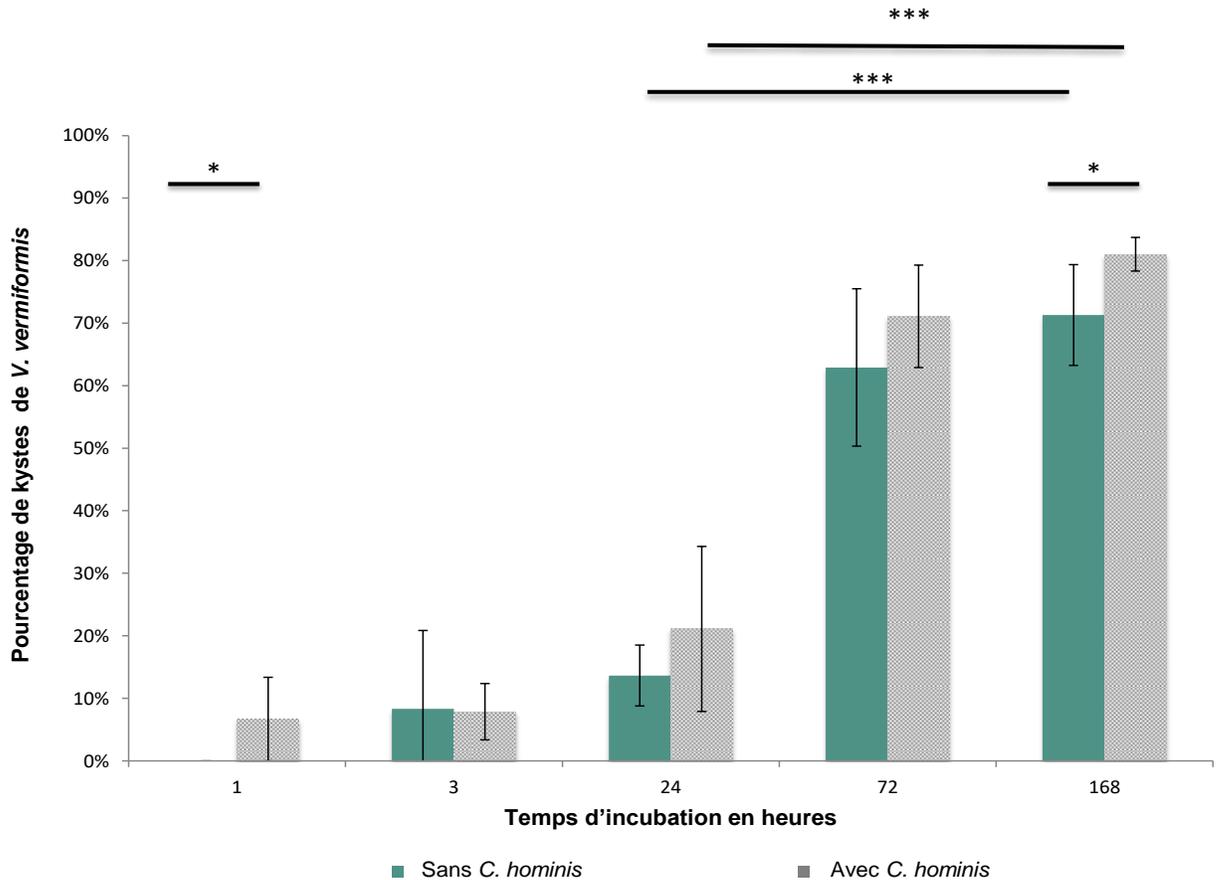


Figure 61 : Dénombrement des kystes de *V. vermiformis* en co-incubation avec *C. hominis* selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique (grossissement x 200). $p\text{-value}$: * < 0,01. N = 2

1.3.2 Dénombrement des oocystes de *C. hominis*

La quantité d'oocystes au sein du biofilm a augmenté au cours du temps en l'absence d'amibes libres passant de $4.03 \pm 0.21 \log_{10}$ à 1h à $4.37 \pm 0.07 \log_{10}$ à J7 (168h) ($p\text{-value} < 0.01$) soit une augmentation d'un facteur de 1.9. En présence d'*A. castellanii* et de *V. vermiformis*, cette quantité d'oocystes est restée constante au cours du temps. Pour les temps les plus tardifs (≥ 72 heures) la quantité d'oocystes était plus faible en présence d'amibes libre

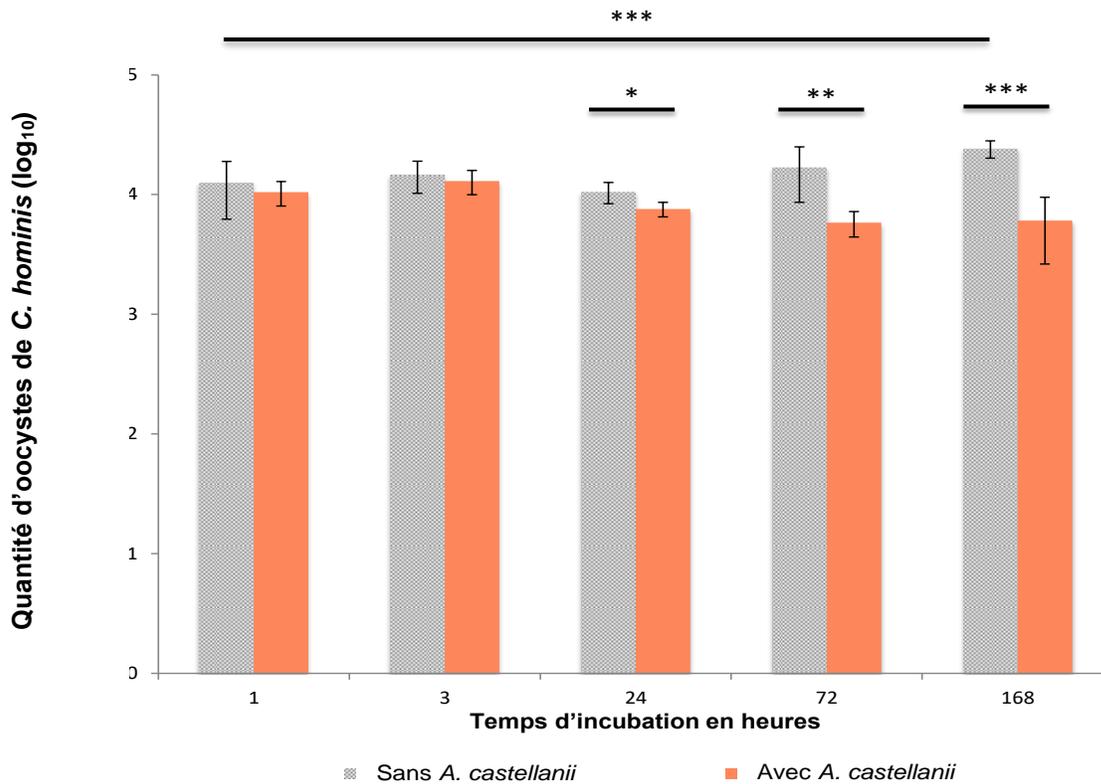
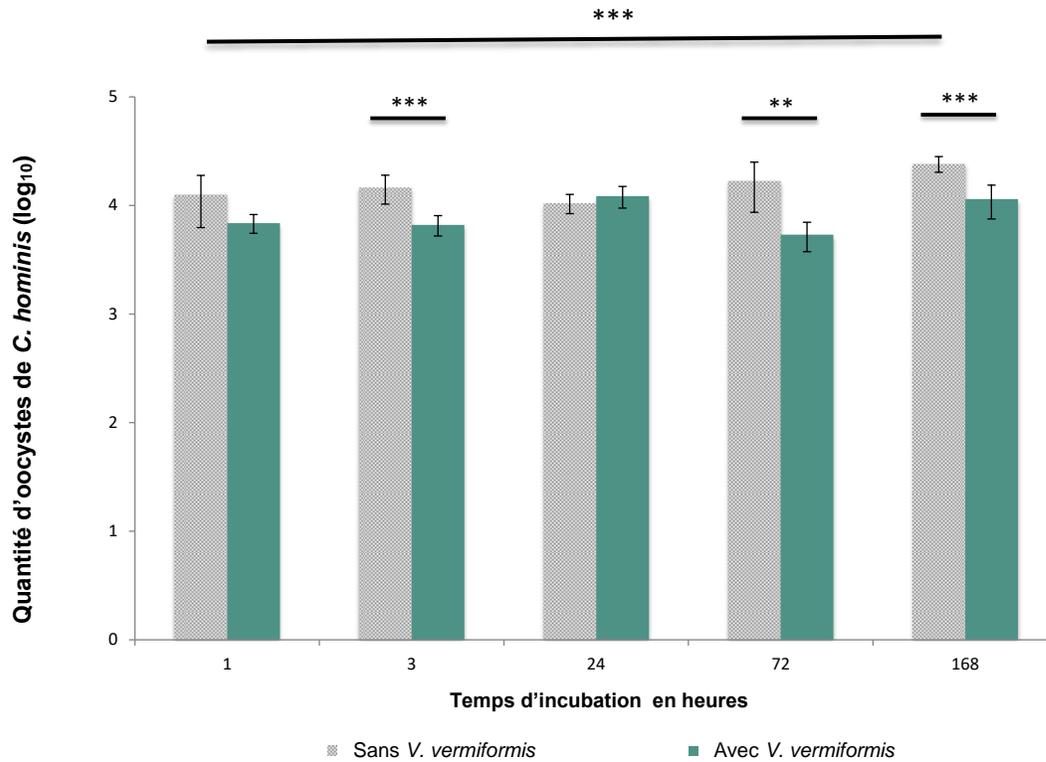


Figure 62 : Dénombrement des oocystes de *C. hominis* en co-incubation avec *A. castellanii* selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique (grossissement x 400).
 $p\text{-value}$: * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001. N = 2.



**Figure 63 : Dénombrement des oocystes de *C. hominis* en co-incubation avec *V. vermiformis* selon une cinétique de temps en condition biofilm en microscopie optique (grossissement x 400).
p-value : ** < 0.01 ; *** < 0.001. N = 2.**

1.3.3 Évaluation de l'infectiosité des oocystes de *C. hominis*

En condition biofilm (comme en planctonique), aucune modification de l'infectiosité des oocystes de *C. hominis* n'a été observée en présence d'*A. castellanii* ou de *V. vermiformis* (Figures 64 et 65).

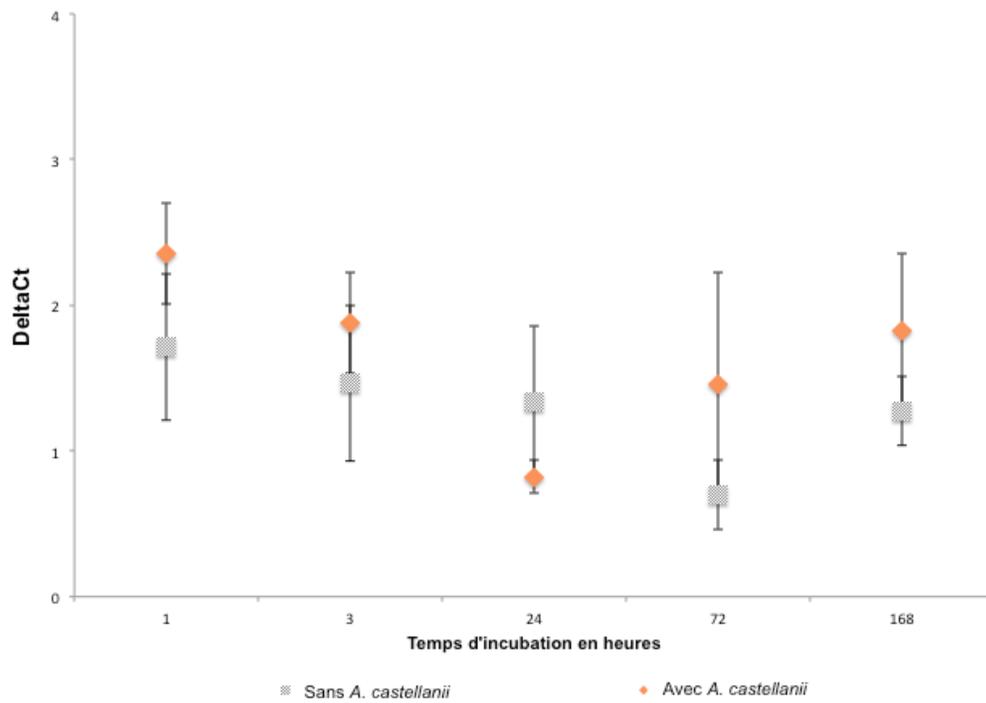


Figure 64 : Évaluation de l'infectiosité des oocystes *C. hominis* en présence d'*A. castellanii* selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR. N = 2.

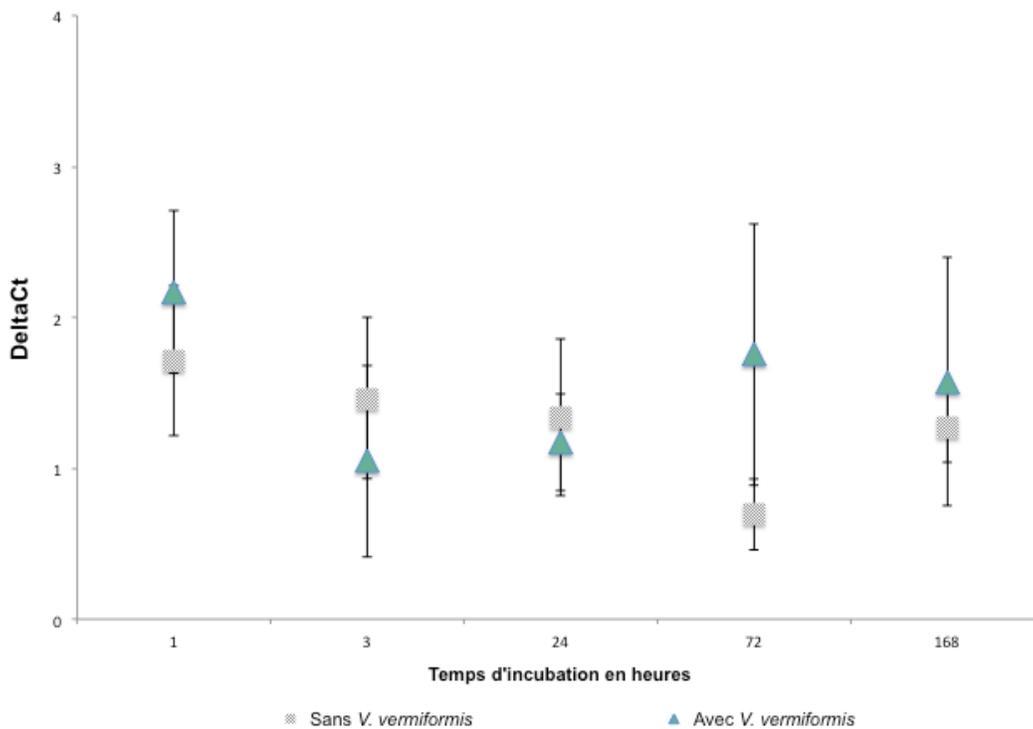


Figure 65 : Évaluation de l'infectiosité des oocystes *C. hominis* en présence de *V. vermiformis* selon une cinétique de temps en condition biofilm par CC-qPCR. N = 2.

1.4 Synthèse des résultats en condition planctonique et de biofilm

Un récapitulatif des résultats obtenus concernant la survie et l'enkystement d'*A. castellanii* et de *V. vermiformis* en présence ou non d'oocystes de *C. hominis* en condition planctonique et biofilm est présenté dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Synthèse des interactions entre les oocystes de *C. hominis* et le comportement d'*A. castellanii* ou de *V. vermiformis* au cours du temps.

		<i>A. castellanii</i>		<i>V. vermiformis</i>	
		Planctonique	Biofilm	Planctonique	Biofilm
Concentration	Sans oocystes	Diminution progressive	Augmentation puis stagnation	Diminution progressive	Augmentation puis stagnation
	Avec oocystes	Constante		Constante	
Enkystement	Sans oocystes	Constante	Augmentation	Constante	Augmentation
	Avec oocystes				

En condition planctonique, la présence d'oocystes de *C. hominis* a joué un rôle sur la concentration en amibes libres mais n'a pas entraîné de modification de l'enkystement au cours du temps. En condition biofilm, la présence d'oocystes n'a pas modifié la quantité ni le taux d'enkystement d'*A. castellanii* et de *V. vermiformis* au cours du temps. Des résultats différents ont cependant été observés entre la condition planctonique et biofilm

Pour les oocystes de *C. hominis*, un récapitulatif similaire est présenté dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Synthèse des interactions entre les oocystes de *C. hominis* et *A. castellanii* ou *V. vermiformis* sur la concentration et l'infectiosité des oocystes au cours du temps.

		Oocystes de <i>C. hominis</i>	
		Planctonique	Biofilm
Concentration	Sans amibes libres	Constante	Augmentation progressive
	Avec <i>A. castellanii</i>		Constante
	Avec <i>V. vermiformis</i>		
Infectiosité	Avec <i>A. castellanii</i>	Pas de modification	
	Avec <i>V. vermiformis</i>		

2 Discussion

Moins d'une dizaine d'études publiées ont porté sur les interactions entre amibes libres et *Cryptosporidium* et aucune n'a traité des interactions entre amibes libres et *C. hominis* à notre connaissance (Gómez-Couso *et al.*, 2007; Scheid and Schwarzenberger, 2011; Stott *et al.*, 2003). Bien que l'espèce *C. hominis* soit désormais reconnue comme potentiellement retrouvée chez plusieurs espèces animales (parfois responsable de la pathologie), cette espèce reste préférentiellement retrouvée chez l'Homme (Razakandrainibe *et al.*, 2018; Widmer *et al.*, 2020). Il en résulte des difficultés d'approvisionnement d'oocystes de *C. hominis* en quantité suffisante. Une infection en modèle animale ne permettant pas d'avoir des quantités suffisantes pour des travaux de recherche. Cette difficulté à se procurer des oocystes de *C. hominis* fait que le plupart des travaux effectués à ce jour sur la pathogénicité et la biologie de *Cryptosporidium* ont été réalisés avec *C. parvum* (Hashim *et al.*, 2006). Il y a donc un manque d'informations dans la littérature sur *C. hominis* bien qu'il soit impliqué de manière importante dans les épidémies de cryptosporidiose et notamment les épidémies hydriques liées aux eaux récréatives. Ainsi, les essais au cours de ces travaux de thèse ont pu être réalisés grâce à l'isolement de *C. hominis* à partir de selles humaines récupérées en contexte épidémique. Cependant, un biais dans le comportement des oocystes a pu en découler car les oocystes de *C. hominis* sur lesquels les travaux ont été réalisés provenaient tous de selles issues d'une épidémie survenue en 2017 et progressivement ces oocystes ont pu perdre en infectiosité et capacité d'interactions avec d'autres microorganismes. Par exemple, aucune modification de l'infectiosité de *C. hominis* n'a été observée en présence d'amibes libres contrairement à *C. parvum* (où en présence d'*A. castellanii* une diminution temporaire de l'infectiosité a été observée) et les écarts types obtenus lors de l'évaluation de l'infectiosité des oocystes étaient élevés. Ces résultats pourraient être expliqués par une absence d'interaction entre la souche de *C. hominis* et les espèces d'amibes libres testées ou une baisse d'infectiosité initiale de *C. hominis* du fait de la conservation prolongée ayant eu lieu avant analyse. Lors de l'analyse en CC-qPCR, les Ct étaient plus faibles que lors de l'étude avec *C. parvum* même sans cellules, pour plusieurs raisons, la première pourrait être la plus petite quantité d'oocystes utilisée dans cette étude liée aux difficultés d'approvisionnement en oocystes de *C. hominis*, la deuxième pourrait être l'âge des oocystes, la troisième pourrait être liée à une perte d'oocystes et de sporozoïtes par l'utilisation d'acide taurocholique suivi d'une centrifugation.

En condition planctonique, la concentration en amibes libres a diminué au cours du temps en l'absence d'oocystes de *C. hominis*. Cependant en présence d'oocystes, cette concentration est restée constante. L'enkystement demeurant constant en condition planctonique avec et sans présence d'oocystes. Il semblerait donc que la présence des oocystes de *C. hominis* facilite la persistance des amibes libres dans l'eau en condition planctonique. Il a été montré que les amibes libres avaient une

sensibilité différente selon les souches de micro-organismes ce qui est confirmé par notre étude (de Moraes and Alfieri, 2008; Wang and Ahearn, 1997). En effet, les amibes libres semblent être influencées par la présence de *C. hominis* contrairement à celle de *C. parvum*. Dans la partie précédente de cette thèse, nous avons montré que la présence d’ocystes de *C. parvum* ne modifiait pas la concentration en amibes libres au cours du temps contrairement à *C. hominis*. Cette différence pourrait s’expliquer par l’âge des oocystes utilisés. En effet, les oocystes de *C. hominis* étaient beaucoup plus âgés (> 1 an) et donc probablement associés à une mortalité plus importante que les oocystes de *C. parvum* utilisés dans les 3 mois suivant leur récupération dans les selles de veaux. Les amibes libres seraient donc potentiellement plus sensibles à la présence d’ocystes plus anciens voir morts. Il a été montré, une croissance amibienne plus importante en présence de proies vivantes cependant une croissance amibienne a été observée avec des proies inactivées par la chaleur. La prolifération amibienne dépendrait donc à la fois de l’espèce en contact mais également l’état de cette espèce (vivante ou inactivée) (Pickup *et al.*, 2007).

En condition biofilm, après 24 heures la quantité d’amibes libres retrouvée au sein du biofilm semblait stagner avec ou sans oocystes tandis que dans les premières heures, une quantité plus importante d’amibes a été retrouvée dans le biofilm en présence d’ocystes. La présence des oocystes au sein du biofilm est quant à elle constante en l’absence d’amibes libres dès les premières heures. Les oocystes sédimenteraient donc rapidement au sein du biofilm et pourraient faciliter la sédimentation des amibes libres en mélange. Un état d’équilibre s’installerait donc au sein du biofilm entre les microorganismes en présence à partir de 24 heures. Concernant l’enkystement des amibes libres, en planctonique, il reste constant en présence ou non d’ocystes de *C. hominis* alors qu’en biofilm l’enkystement augmente au cours du temps.

De façon intéressante, en condition biofilm et sans amibes libres, les oocystes semblent légèrement proliférer au cours du temps (multiplication par un facteur 2) alors que la concentration reste constante en présence d’amibes libres. Les amibes libres pourraient légèrement phagocyter les oocystes à ces stades ou bien interagir avec les bactéries du biofilm ayant alors un retentissement sur la concentration en oocystes. Cette différence de concentration en oocystes en condition biofilm a également été observée avec *C. parvum* dans la partie précédente de cette thèse. Dans la littérature une augmentation de la concentration en oocystes par 2 à 3 dans un biofilm de *P. aeruginosa* a également été rapportée, complétée par la mise en évidence de la présence de différents stades de développement comme la présence de sporozoïtes, de trophozoïtes ou encore de mérozoïtes de type I et II (Koh *et al.*, 2013).

Étude de l'effet de traitements de désinfection sur les mélanges *C. parvum* et amibes libres

Ce travail fera l'objet d'une publication.

1 Résultats

1.1 But de l'étude

Différents types de traitement ont été évalués : 1) physiques (Chaleur à + 95°C et congélation à – 80°C) et 2) chimiques (Hypochlorite de Sodium 100 ppm et 36 000 ppm et NaOH 20%). Ces types de traitement sont couramment utilisés dans les processus de désinfection. Cependant des doses élevées ont été évaluées pour renforcer le stress subi. Le but de cette étude a été d'évaluer la réponse aux traitements des microorganismes en présence. L'hypothèse étant qu'en condition de stress, la phagocytose de *C. parvum* par les amibes libres pouvait être favorisée : 1) pour augmenter l'apport nutritionnel des amibes libres ou 2) pour faciliter la résistance de *C. parvum* aux traitements grâce à la protection intra-amibienne.

1.2 Évaluation de l'effet de traitements de désinfection sur la survie et

l'enkystement des amibes libres

1.2.1 Abattement des amibes libres

Parmi les traitements testés, 2 à 2,5 log₁₀ d'abattement ont été observé pour *A. castellanii*, selon les conditions : NaOH 20% pendant une heure (2,26 +/- 0,25 log₁₀), Hypochlorite de sodium 36 000 ppm pendant 30 minutes (2,50 +/- 0,32 log₁₀), +95°C pendant 15 minutes (2,34 +/- 0,35 log₁₀) et – 80°C pendant 48 heures (2,22 +/- 0,22 log₁₀). En revanche pour l'hypochlorite de sodium 100 ppm pendant une heure, l'abattement était inférieur à 1 log₁₀ (0,87 +/- 0,09 log₁₀) (Figure 66). En présence concomitante de *C. parvum*, l'action des traitements n'a pas été modifiée.

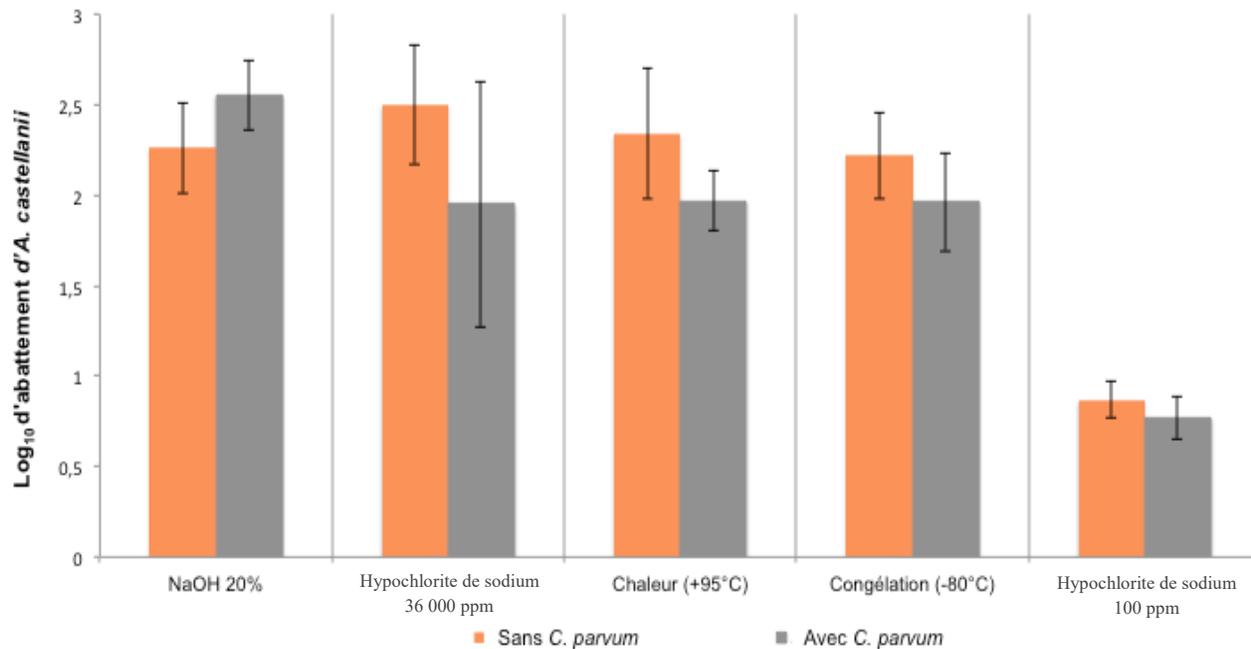


Figure 66: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'abattement d'*A. castellanii* en présence d'oocystes de *C. parvum*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 200). N = 3.

Des résultats similaires ont été obtenus pour *V. vermiformis* sauf pour la condition chaleur (+95°C) où il a été observé un log₁₀ d'abattement inférieur à 2 (1,20 +/- 0,19 log₁₀). La présence d'oocystes de *C. parvum* n'a pas eu d'influence sur l'effet des traitements sur *V. vermiformis* à l'exception de la condition hypochlorite de sodium 36 000 ppm. L'abattement observé était plus important avec oocystes que sans oocystes : 2,57 +/- 0,09 log₁₀ et 2,32 +/- 0,11 log₁₀ respectivement (*p-value* < 0,01) (Figure 67).

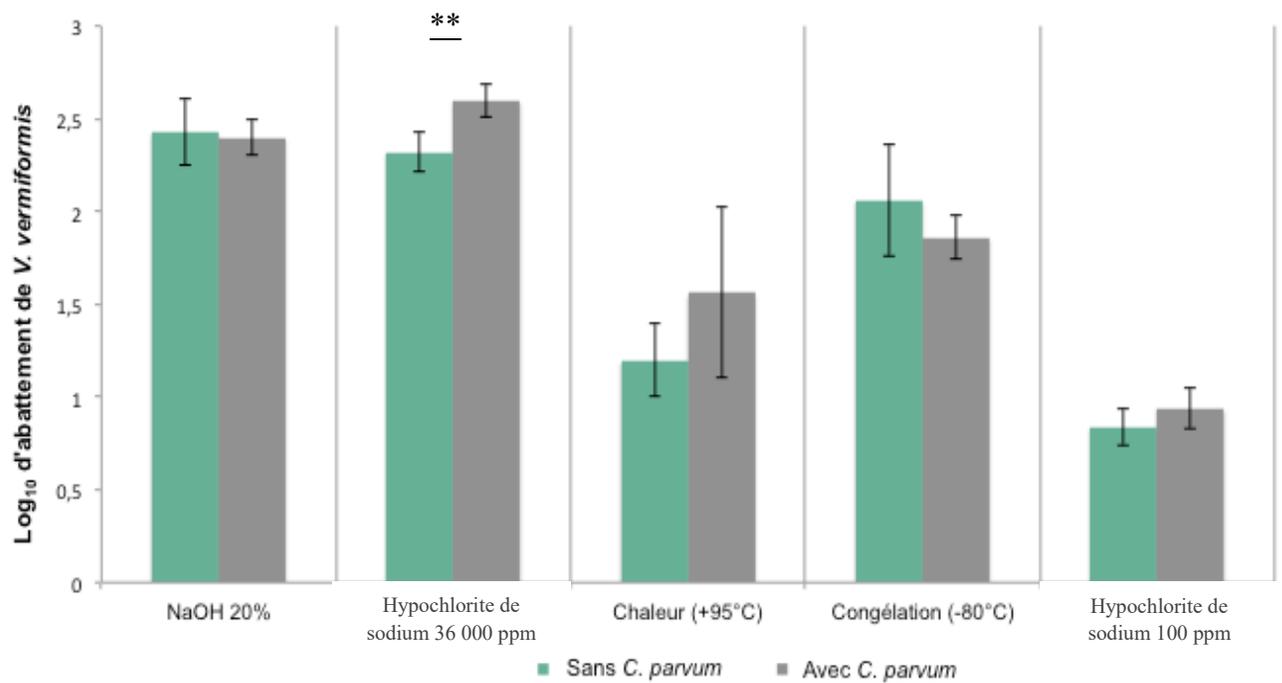


Figure 67: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'abattement de *V. vermiformis* en présence d'oocystes de *C. parvum*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 200). *p*-value: ** < 0.01. N = 3.

Parmi tous les traitements évalués, seule la chaleur (+95°C) était plus efficace sur *A. castellanii* que sur *V. vermiformis* (2,34 +/- 0.35 log₁₀ et 1,20 +/- 0.19 log₁₀ respectivement) (*p*-value < 0,001) (Figure 68).

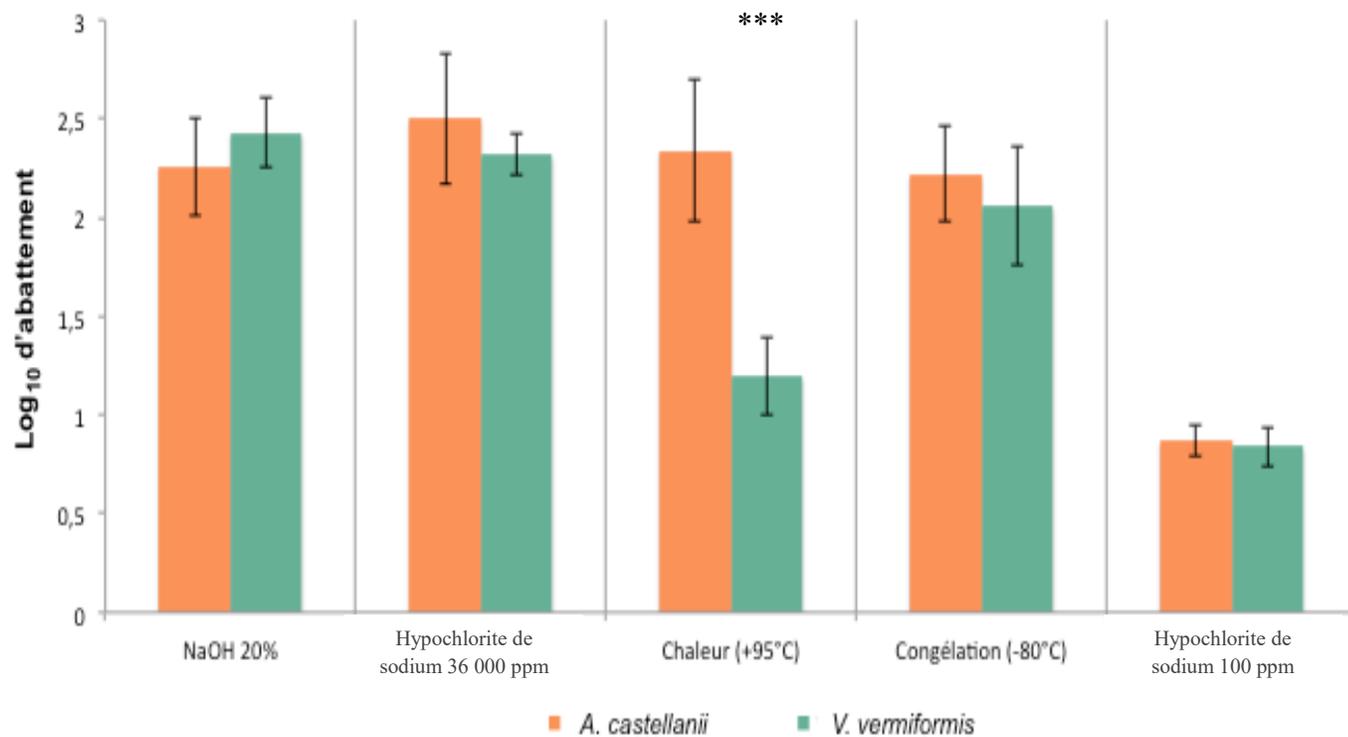


Figure 68: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'abattement d'*A. castellanii* et de *V. vermiformis*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 200). *p*-value : * < 0.001. N = 3.**

1.2.2 Enkystement des amibes libres

Conformément à nos attentes, chacune des conditions testées ont entraîné un accroissement de l'enkystement comparativement à la condition témoin (PBS). La variabilité était importante mais globalement le taux d'enkystement avoisiné les 50% (47 +/- 4% pour le NaOH, 38,7 +/- 23,8 % pour l'hypochlorite de sodium 36 000 ppm, 38.43 +/- 6.07 % pour la congélation) sauf pour le traitement « Chaleur + 95°C » et pour l'hypochlorite de sodium 100 ppm ou il avoisiné les 60% (65.08 +/- 10.92 % et 61. 86 +/- 19,64 % respectivement) (Figure 69).

Concernant l'enkystement d'*A. castellanii*, la présence d'oocystes de *C. parvum* n'a pas eu d'influence sur l'effet des traitements sauf pour l'hypochlorite de sodium 100 ppm où la présence d'oocystes a entraîné un enkystement moins important par rapport à la condition sans oocystes (33, 07 +/- 5, 93 % et 61, 86 +/- 19,64 % respectivement) (p -value < 0.001).

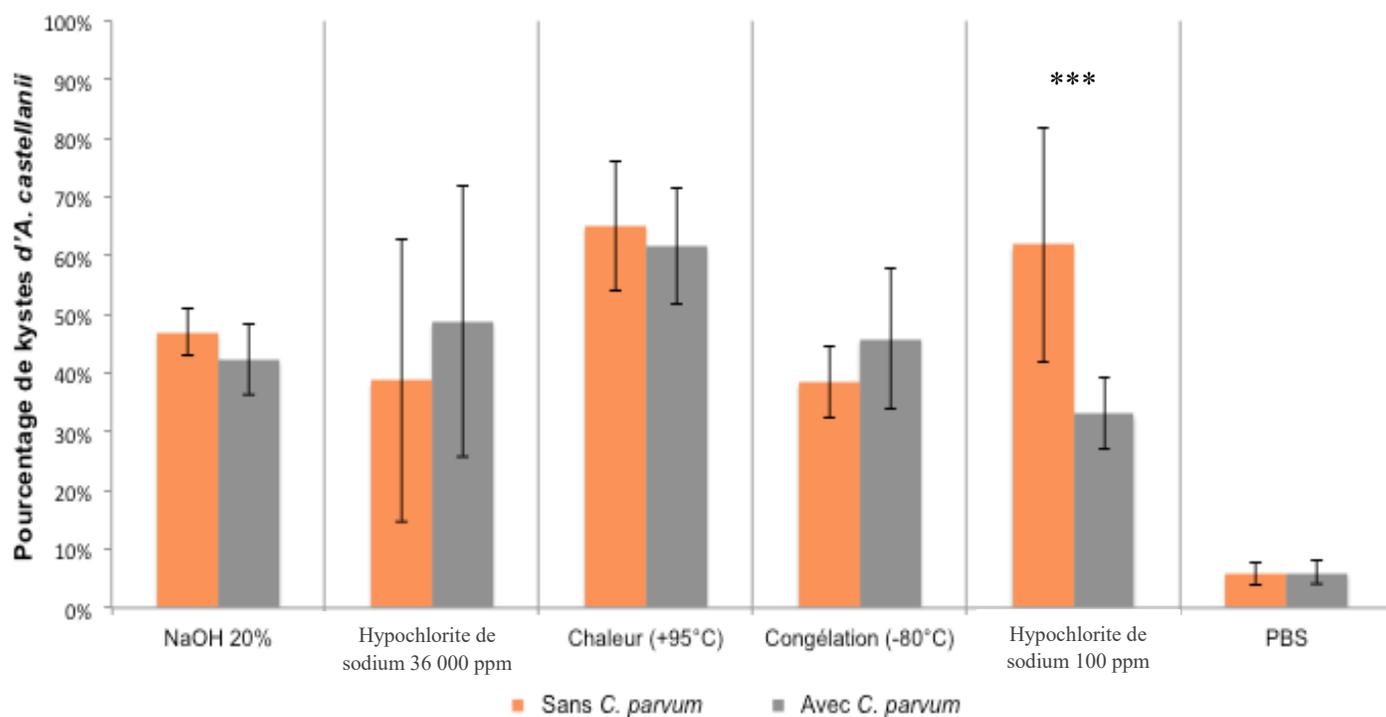


Figure 69: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'enkystement d'*A. castellanii* en présence ou non d'oocystes de *C. parvum*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 200).
 p -value : *** < 0.001. N = 3.

Concernant *V. vermiformis*, une plus grande disparité d'enkystement a été observée selon les conditions testées. Environ 80% d'enkystement a été observé pour la condition hypochlorite de sodium 36 000 ppm et la condition NaOH 20% (83 +/- 3% et 84 +/- 4% respectivement). Les autres conditions testées ont démontré des taux d'enkystement légèrement supérieurs à la condition témoin (PBS) (18 +/- 5% pour la chaleur, 38 +/- 3% pour la congélation, 25 +/- 12% pour l'hypochlorite de sodium 100 ppm et 4 +/- 0, 38 % pour la condition témoin) (Figure 70).

La présence d'oocystes de *C. parvum* ne semble pas avoir globalement influencée l'enkystement de *V. vermiformis*. Une légère diminution de l'enkystement a été observée en présence d'oocystes pour la condition congélation -80°C (28 +/- 6% et 38 +/- 3%) (p -value < 0.01).

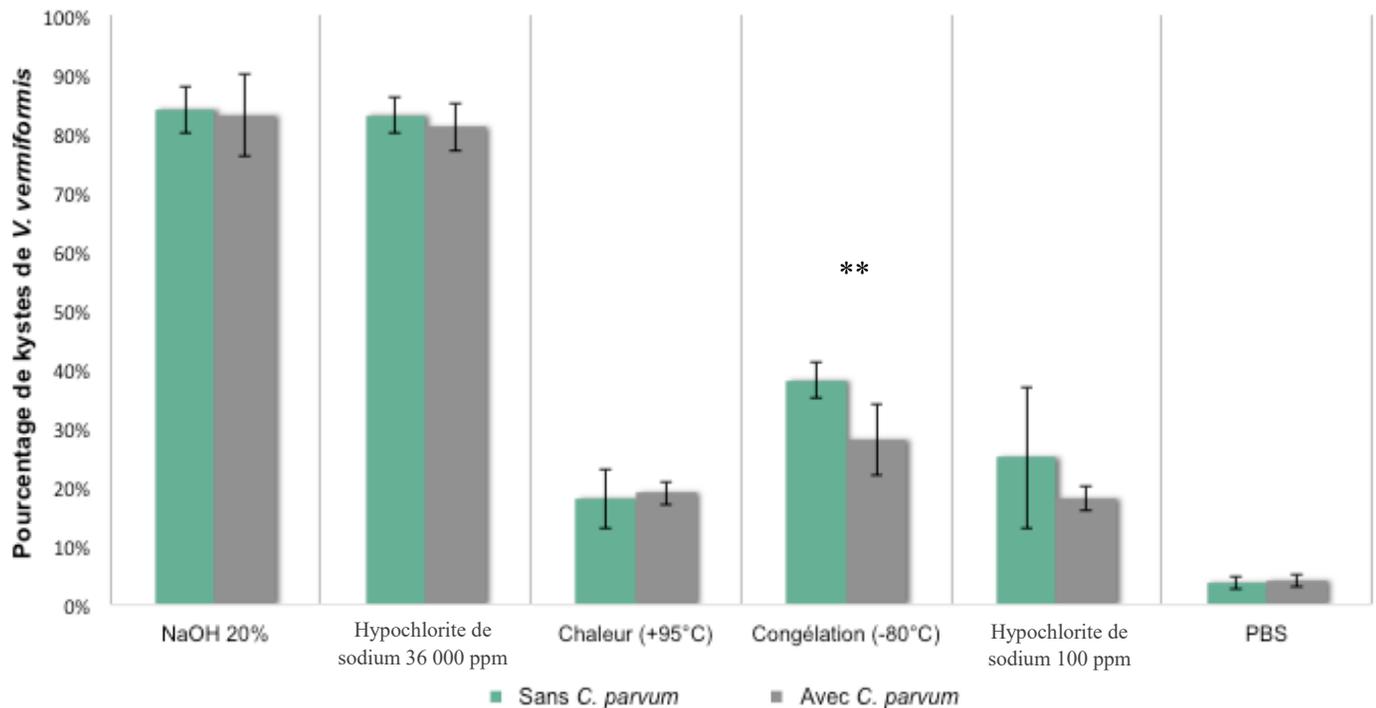


Figure 70: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur l'enkystement de *V. vermiformis* en présence d'oocystes de *C. parvum*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 200). p -value : ** < 0.01. N = 3.

La figure 71, montre que l'effet des traitements sur l'enkystement n'était pas comparable entre *A. castellanii* et *V. vermiformis*. Le taux d'enkystement de *V. vermiformis* était plus élevé que celui d'*A. castellanii* en présence de NaOH 20% (84 +/- 4 % et 47 +/- 4% respectivement) et d'hypochlorite de sodium 36 000 ppm (83 +/- 3% et 38,7 +/- 23,8 % respectivement) (*p-value* < 0.001). À l'inverse, la chaleur (+95°C) et l'hypochlorite de sodium 100 ppm ont entraîné un taux d'enkystement plus important d'*A. castellanii* que de *V. vermiformis* (65.08 +/- 10.92% et 18 +/- 5% pour la chaleur respectivement, et 61.86 +/- 19,64 % et 25 +/- 12% pour l'hypochlorite de sodium 100 ppm respectivement) (*p-value* < 0,001)

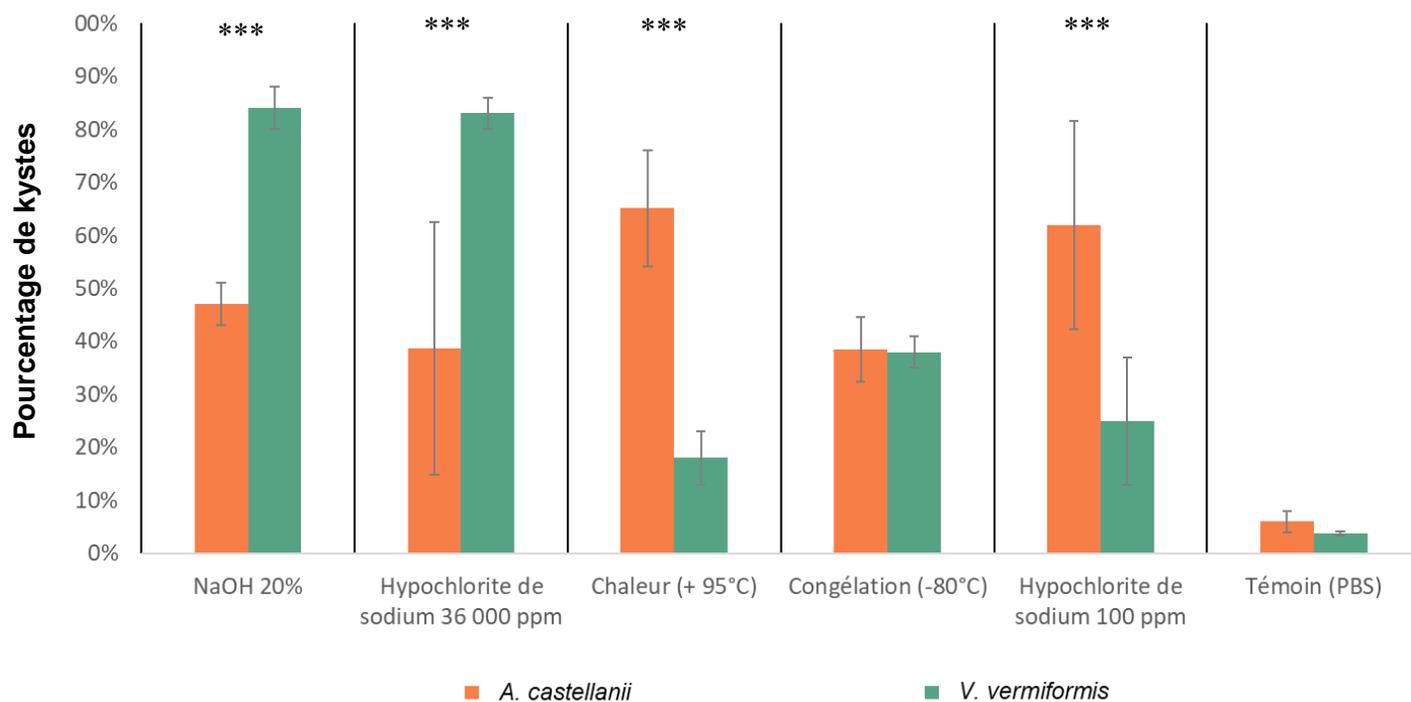


Figure 71: Effets de différents traitements physiques et chimiques sur le pourcentage de kystes d'*A. castellanii* et de *V. vermiformis*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 200). *p-value* : * < 0.001. N = 3.**

1.3 Évaluation de l'effet des traitements de désinfection sur les oocystes de *C. parvum*

1.3.1 Sur l'abattement des oocystes de *C. parvum*

La Chaleur (+95°C), la congélation (-80°C) et l'hypochlorite de sodium 36 000 ppm étaient les traitements les plus efficaces, avec pour effet, un abattement des oocystes compris entre 2 et 2,5 log₁₀ (2,49 +/- 0,26 log₁₀, 2,27 +/- 0,18 log₁₀ et 1,76 +/- 0,58 log₁₀ respectivement). Un effet de la présence concomitante d'amibes libres (*A. castellanii* et *V. vermiformis*) a été observé uniquement pour les traitements thermiques ou le taux d'abattement d'oocystes était plus élevé en l'absence qu'en présence d'amibes libres. Pour la chaleur le taux d'abattement était de 2,49 +/- 0,26 en l'absence d'amibes libres et de 1,94 +/- 0,11 en présence d'*A. castellanii* (*p-value* < 0,001). Pour la congélation, le taux d'abattement était de 2,27 +/- 0,18 en l'absence d'amibes libres et de 1,82 +/- 0,36 en présence d'*A. castellanii* et de 1,55 +/- 0,33 en présence de *V. vermiformis* (*p-value* < 0,001). (Figures 72 et 73)

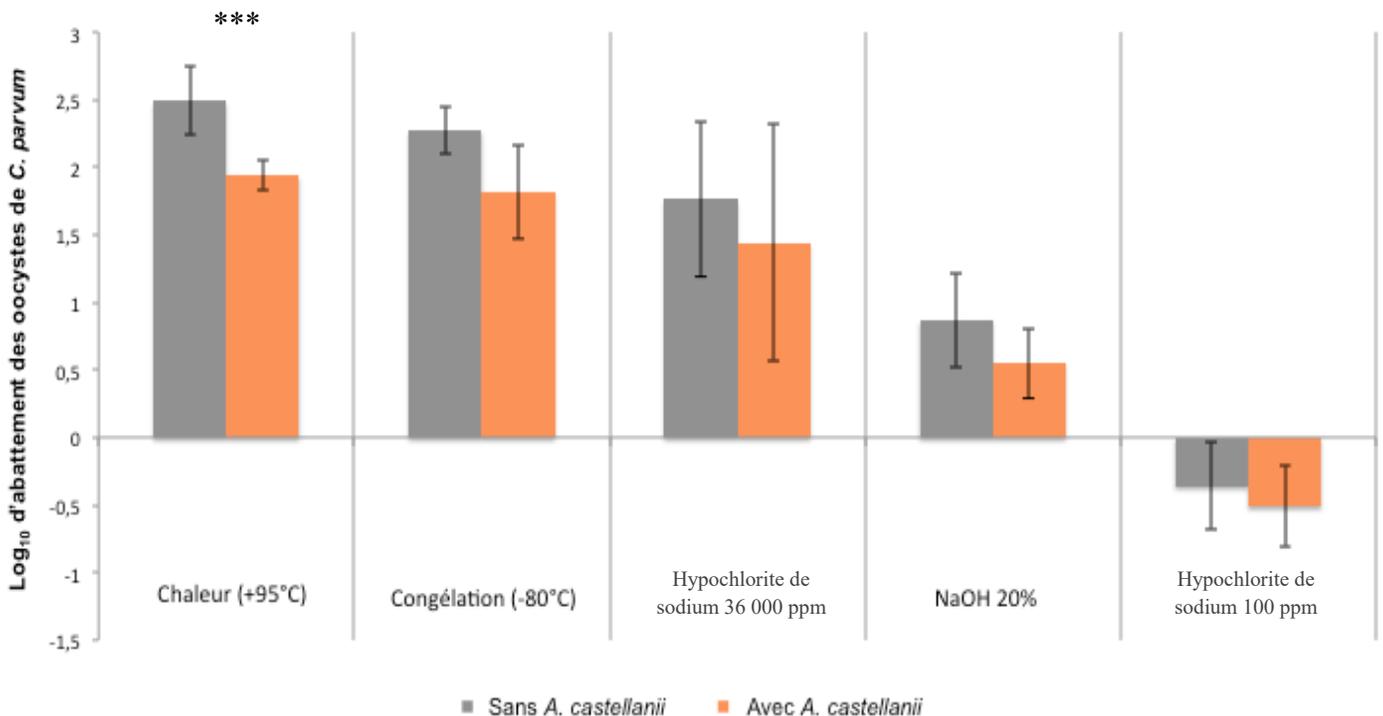


Figure 72 : Effets de différents traitements sur l'abattement des oocystes de *C. parvum* en présence ou non d'*A. castellanii*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 400).
N = 3. *p-value* : *** < 0.001

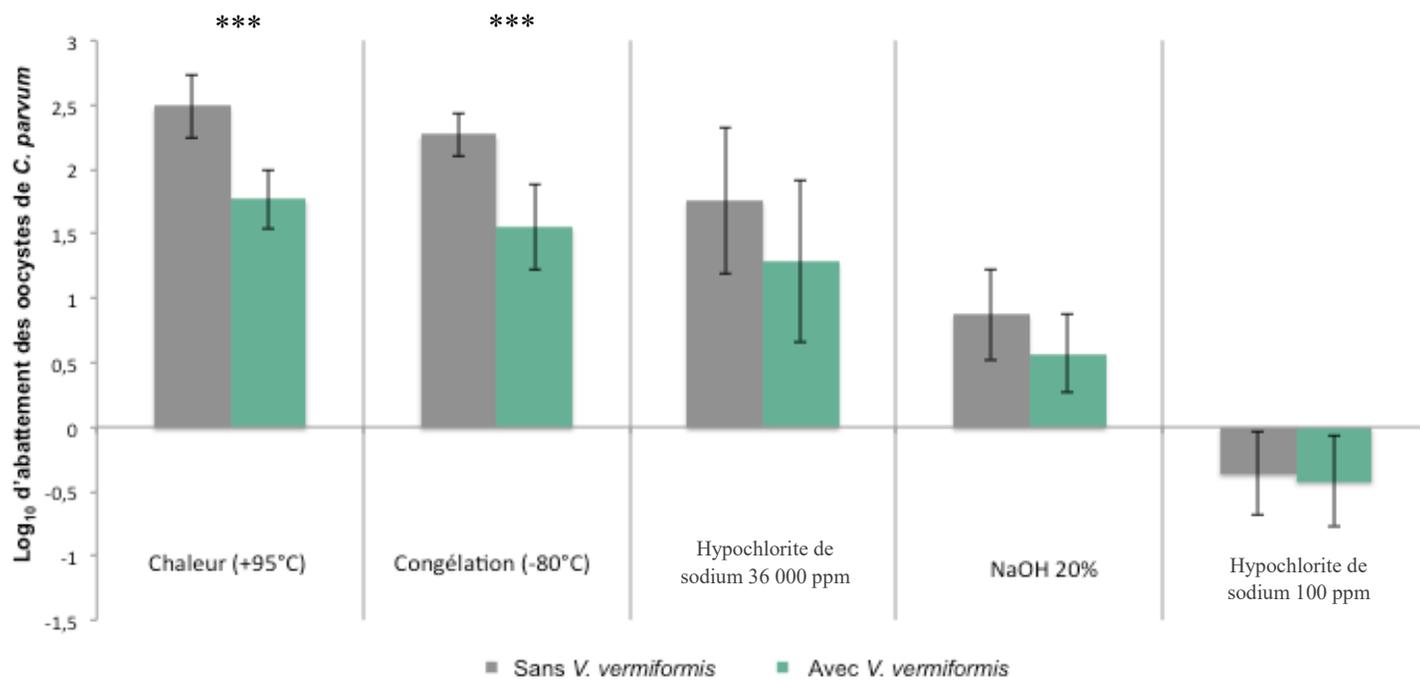


Figure 73: Effets de différents traitements sur l'abattement des oocystes de *C. parvum* en présence de *V. vermiformis*. Résultats obtenus après dénombrement en microscopie optique (grossissement x 400).
 N = 3. : *p-value* : *** < 0.001

1.3.2 Sur l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*

Une perte d'infectiosité des oocystes (par rapport à la condition témoin PBS) a été observé uniquement avec les conditions : chaleur (+95°C) et congélation (-80°C) (p -value < 0.001). La condition hypochlorite de sodium 36000 ppm a entraîné une baisse de l'infectiosité des oocystes non significative (Figure 74). La présence d'amibes libres n'a pas influencé l'effet des traitements sur l'infectiosité des oocystes.

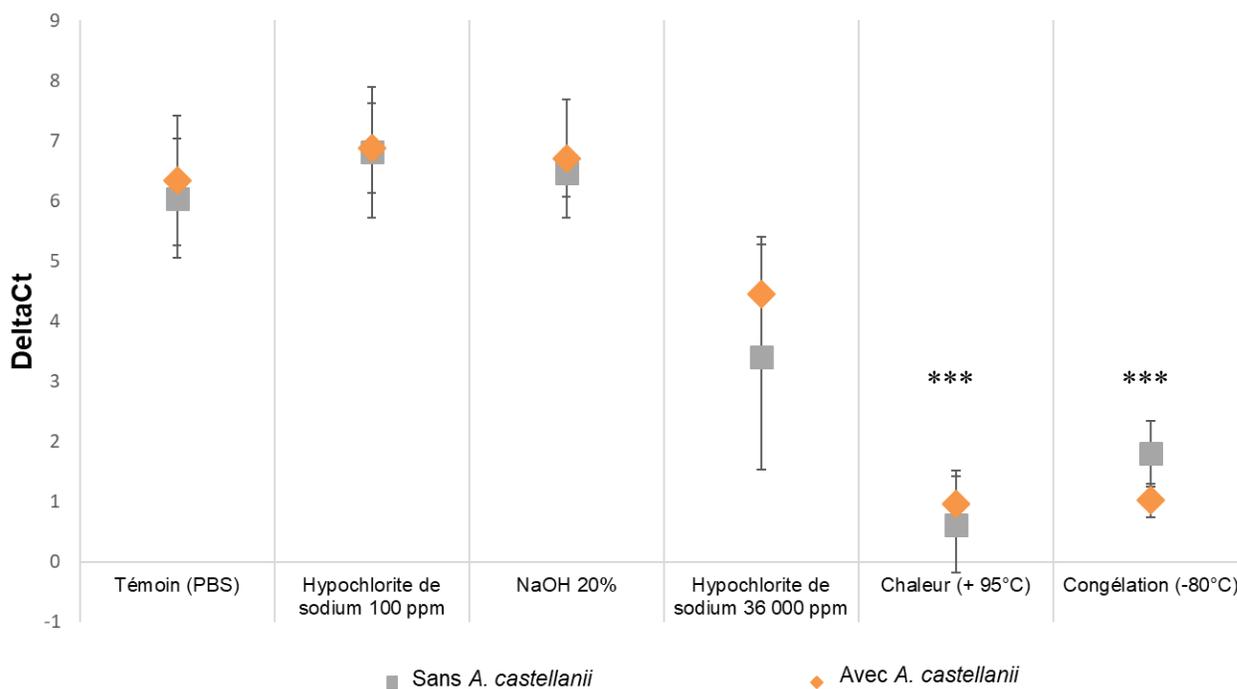


Figure 74 : Effets de différents traitements sur l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* en présence d'*A. castellanii*. Évalué par CC-qPCR. N=3. p -value : ***<0.001 (calculé par rapport au témoin).

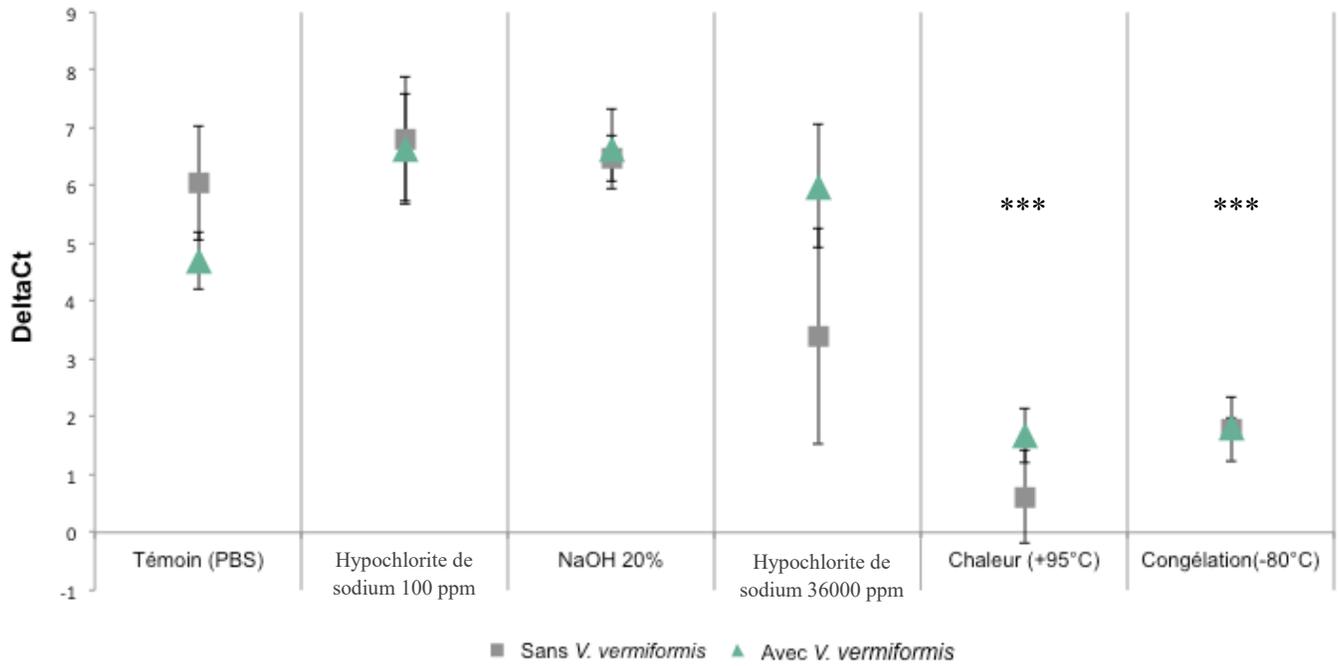


Figure 75 : Effets de différents traitements sur l'infectiosité des oocystes de *C. parvum* en présence de *V. vermiformis*. Évalué par CC-qPCR. N=3. *p-value* : *<0.001(calculé par rapport au témoin).**

2 Discussion

Pour la première fois à notre connaissance, cette étude a permis d'évaluer l'effet de la présence concomitante d'amibes libres et de *C. parvum* sur l'efficacité de traitements de désinfection sur ces parasites. Nos résultats ont démontré une efficacité variable des traitements selon la dose et selon l'espèce microbienne en présence.

Concernant les amibes libres et leur abattement, un effet dose-dépendant de l'hypochlorite de sodium a été observé. Dans la littérature, il a été rapporté une élimination de l'espèce *V. vermiformis* ($> 4\log_{10}$ d'abattement) après contact avec des concentrations en chlore de 10 à 15 mg/L soit 10 à 15 ppm pendant 30 min et d'*A. castellanii* à des concentrations de 2500 mg/L soit 2500 ppm pendant 10 min (Coulon *et al.*, 2010; Fouque *et al.*, 2014; Kuchta *et al.*, 1993). Dans nos conditions d'essais, les amibes libres étaient plus résistantes au chlore. En effet après contact de nos deux espèces d'amibes libres d'intérêt avec de l'hypochlorite de sodium 100 ppm pendant 1h à +4°C, le taux d'abattement était inférieur à $1\log_{10}$ et était d'environ $2,5\log_{10}$ après contact avec de l'hypochlorite de sodium 36 000 ppm pendant 30 min à +4°C. Ce qui pourrait expliquer ces différences pourrait être la méthode d'étude. Coulon *et al.* a mis en contact le biocide et les amibes libres à température ambiante et a évalué le taux d'abattement après avoir remis en culture les amibes libres pendant 21 jours par évaluation de la prolifération amibienne (Coulon *et al.*, 2010). Kuchta *et al.* a également évalué la prolifération amibienne sur 10 jours après traitement (Kuchta *et al.*, 1993). Notre étude, quant à elle, a évalué le taux d'abattement directement après action du traitement et lavage au PBS par dénombrement en microscopie optique avec l'aide du bleu Trypan qui est un marqueur de viabilité. Cette différence pourrait donc potentiellement être due à un effet rémanent de l'hypochlorite de sodium sur les amibes libres, effet qui n'a pas pu être évalué dans cette étude.

De plus, contrairement aux données de la littérature qui ont montré que *V. vermiformis* était plus sensible au chlore qu'*A. castellanii*, nos résultats n'ont pas objectivé une telle différence (Coulon *et al.*, 2010; Fouque *et al.*, 2014; Kuchta *et al.*, 1993). Coulon *et al.* qui a utilisé différentes souches d'amibes libres, a montré dans son étude que l'efficacité des désinfectants et notamment de l'hypochlorite de sodium variait selon les souches d'*Acanthamoeba* testées et que les souches environnementales étaient plus résistantes que les souches de collections (Coulon *et al.*, 2010). Dans notre étude, nous avons utilisées des souches environnementales, souches cultivées de manière axénique depuis longtemps, méthode de culture dont il a été montré dans la littérature qu'elle faisait perdre aux amibes libres leur capacité de résistance (Coulon *et al.*, 2010; Köhler *et al.*, 2008; Pumidonning *et al.*, 2010). Toutes ces études, ainsi que la nôtre, montrent tout de même que le chlore reste inefficace sur des kystes d'amibes

libres à des concentrations de 2 à 5 ppm utilisées pour contrôler la flore microbienne dans les réseaux d'eaux potables.

Dans la littérature il a été montré que les kystes et trophozoïtes de *V. vermiformis* et de plusieurs espèces du genre *Acanthaomeba* étaient inactivés à des températures comprises entre + 60 et + 70°C (Coulon *et al.*, 2010; Fouque *et al.*, 2014; Kuchta *et al.*, 1993). Il a ainsi été démontré que les kystes et trophozoïtes de *V. vermiformis* ne survivaient pas à un traitement de + 60°C pendant 30 min. A + 55°C pendant 30 minutes, le taux d'abattement observé était de plus de 3 log₁₀ (Kuchta *et al.*, 1993). Tandis que selon Coulon *et al.*, après exposition à +55°C pendant 10 min, le taux d'abattement ambien était < 1 log₁₀ pour plusieurs espèces du genre *Acanthamoeba* sous forme kystique comme *A. castellanii* ou encore *A. polyphaga* (environnementales ou de collections) (Coulon *et al.*, 2010). Le taux d'abattement était > 4 log₁₀ pour une exposition à +65°C pendant 10 min. D'après nos travaux, un traitement à + 95°C pendant 15 min a entraîné un taux d'abattement < 1.5log₁₀ pour *V. vermiformis* et < 2.5 log₁₀ pour *A. castellanii*. La différence observée avec les études de Kuchta *et al.* et Coulon *et al.*, pourrait s'expliquer par la durée d'exposition au traitement et à la méthodologie employée (évaluation de l'effet immédiatement après exposition au traitement versus après remise en culture) (Coulon *et al.*, 2010; Kuchta *et al.*, 1993). De plus dans notre étude nous avons pu observer que la chaleur extrême était plus efficace sur *A. castellanii* que sur *V. vermiformis*. Ceci concorde avec les données de la littérature relatant une forte prévalence de *V. vermiformis* dans les réseaux d'eaux chaudes (Coulon *et al.*, 2010 ; Köhler *et al.*, 2008 ; Pumidonning *et al.*, 2010).

Concernant l'enkystement des amibes libres, une variabilité plus importante a été observée entre *A. castellanii* et *V. vermiformis*. *V. vermiformis* a atteint des taux d'enkystement très élevés (≈80%) pour les conditions chimiques drastiques évaluées (NaOH 20% et Hypochlorite de sodium 36000 ppm), tandis que pour les autres conditions testées l'enkystement a atteint seulement 20%. Pour *A. castellanii*, une tendance similaire, bien que plus faible que ceux de *V. vermiformis* (maximum 60% d'enkystement), a été observée après exposition aux traitements chimiques (à l'exception du traitement chaleur +95°C). Ainsi l'enkystement semblerait une réponse plutôt observée au stress chimique. Il pourrait s'agir d'une réponse amibienne à la perturbation métabolique engendrée par le stress chimique, permettant progressivement aux amibes de se mettre en état de dormance pour limiter leurs fonctions métaboliques. À l'inverse, les stress thermiques importants évalués dans cette étude pourraient être trop brutaux pour permettre aux amibes libres de s'adapter et de se mettre en dormance. Cependant il a été montré dans la littérature que les amibes libres de l'espèce *A. castellanii* s'enkystaient en 16 à 24h et celle de *V. vermiformis* en 9h (Hughes *et al.*, 2003; Neff *et al.*, 1964). Dans cette étude l'enkystement a été évalué directement après les traitements ce qui indiquerait que finalement ce sont des pré-kystes qui ont été dénombrés dont le délai d'enkystement varie selon les conditions d'études.

Concernant les oocystes de *C. parvum*, pour les températures très basses, il a été montré par Fayer et Nerad, qu'il n'y avait pas de stades de développement parasitaire dans les tissus de souris (iléon, caecum et colon) après que les oocystes aient subi un traitement à -70°C pendant 1h et à -20°C pendant 24h (Fayer and Nerad, 1996). Notre étude confirme qu'une température très faible peut inactiver les oocystes, ici pendant 48h à -80°C. Pour les températures plus élevées, il a été montré par Moriarty *et al.* qu'il fallait une température de +60°C pendant 45 secondes ou +75 °C pendant 20 secondes pour que les oocystes soient non infectieux. Cependant, même si les oocystes étaient non infectieux, ils restaient viables à 71.6% après traitement à +60°C et 45.9% après traitement à +75°C (Fayer and Nerad, 1996). Nos présents travaux ont démontré un taux d'abattement des oocystes supérieur à 2 log₁₀ (soit 99%) et une infectiosité significativement diminuée après 15 min à +95°C. Le taux d'abattement dans notre étude était plus élevé que dans celle de Moriarty *et al.* probablement lié au fait que la température étudiée était beaucoup plus élevée ou encore lié à la méthodologie. Moriarty *et al.* a évalué la viabilité des oocystes grâce à un colorant vital probablement plus subjectif que la méthodologie utilisée dans notre étude (cc-qPCR) (Moriarty *et al.*, 2005).

Pour le chlore libre, il a été montré qu'il fallait une concentration entre 8 et 16 g/L soit 8 000 à 16 000 ppm pendant 24h pour inactiver 100 % des oocystes (Smith *et al.*, 1989) et 80 mg/L soit 80 ppm pendant 2h pour inactiver 99% des oocystes (Korich *et al.*, 1990). Dans notre étude l'hypochlorite de sodium 100 ppm n'a pas eu d'effet sur l'abattement ni sur l'infectiosité des oocystes mais le temps de contact avec ce biocide était plus court que dans les autres études, le temps de contact était ici d'une heure. L'hypochlorite de sodium 36 000 ppm a entraîné une diminution non significative de l'infectiosité des oocystes et le temps de contact était encore également plus court (30 min). Ceci pourrait être dû au fait que pour évaluer la viabilité des oocystes les études de Smith *et al.* et de Korich *et al.*, se sont basés sur le dékystement des oocystes et que pour évaluer l'infectiosité des oocystes, ils ont travaillé en modèle animal (Korich *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1989).

Finalement, notre étude a pu montrer que les amibes libres étaient plus sensibles aux traitements chimiques que les oocystes de *C. parvum*. En effet, les traitements les plus efficaces sur les oocystes ont été les traitements physiques (températures extrêmes : +95 °C et -80°C). Une tendance à une meilleure résistance des oocystes en présence amibienne a été observée. Ce résultat n'étant significatif que pour certaines conditions (chaleur pour *A. castellanii* et *V. vermiformis* et congélation pour *V. vermiformis*). Il semblerait donc que la présence amibienne puisse légèrement favoriser la résistance de *C. parvum* aux traitements de désinfection ce qui pourrait être dû à la phagocytose amibienne des oocystes. En effet, la première partie de cette thèse a montré que certaines espèces d'amibes libres avaient la capacité de phagocyter occasionnellement des oocystes de *C. parvum*. Les amibes libres sont connues pour servir de cheval de Troie pour certains microorganismes nommés ARB (Amoeba resistant Bacteria). Les amibes

libres favorisant la prolifération et la dissémination des ARB dans l'environnement. Il a par exemple été démontré que les amibes libres permettaient la multiplication de *L. pneumophila* en leur sein tout en augmentant leur virulence, leur motilité mais également leur résistance aux médicaments (Greub and Raoult, 2002; Khan, 2006). En effet, les amibes libres peuvent protéger les microorganismes qu'elles renferment des conditions extérieures; des traitements de désinfection ou encore des traitements antibiotiques (Greub and Raoult, 2004; Khan and Siddiqui, 2014). Par exemple, les kystes d'amibe libres protègent l'espèce bactérienne *Shigella sonnei* du chlore puisque après internalisation amibienne, la résistance au chlore de *Shigella sonnei* est augmentée d'un facteur 50 (Greub and Raoult, 2004a; Kilvington and Price, 1990; King *et al.*, 1988; Sandstrom *et al.*, 2011). Il a également été rapporté une survie accrue de certaines espèces bactériennes comme *Mycobacterium avium* ou *Simkania negevensis* dans l'environnement grâce à l'internalisation amibienne (Kahane *et al.*, 2001; Steinert *et al.*, 1998). Après 79 jours à +4°C, l'infectiosité de *S. negevensis*, en présence d'*Acanthamoeba*, était encore supérieure à 50% de l'infectiosité initiale, alors qu'en l'absence d'amibes libres, la bactérie n'a pas survécu après 12 jours (Kahane *et al.*, 2001). Il a également été montré que *V. cholerae* pouvait survivre jusqu'à deux semaines dans les amibes contrairement aux bactéries cultivées individuellement (Saeed *et al.*, 2007).

Nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'utiliser les amibes libres comme modèle d'étude de comportement des oocystes de *C. parvum* face aux traitements de désinfection. Les applications pratiques concerneraient différents secteurs comme l'industrie agro-alimentaire ou les stations de traitement des eaux. L'intérêt étant que *Cryptosporidium* spp. ne se cultive pas et que d'un point de vue éthique les études en modèle animal deviennent des plus en plus difficiles. Un modèle idéal devrait mimer exactement le comportement du microorganisme auquel il se substitue tout en étant moins pathogène. Ainsi pour *Cryptosporidium* spp., un bon modèle devrait être non pathogène, de structure et de taille proche de celles de *Cryptosporidium*, avec un mode de transmission similaire, facilement cultivable, facile à étudier en termes de viabilité et d'infectiosité. Les amibes libres possèdent de nombreux points communs avec les caractéristiques énumérées précédemment. Elles sont non pathogènes pour la majorité des espèces, elles sont facilement cultivables, elles peuvent être dénombrées facilement en microscopie optique et leur viabilité peut être évaluée microscopiquement au bleu de trypan. Concernant leur structure, lorsque les conditions sont défavorables, elles prennent une forme kystique qui est une forme de résistance pouvant se rapprocher de la structure et de la taille de l'oocyste. Les amibes libres sous forme kystique et les oocystes ont tous les deux, une forme sphérique ou ovoïde et leur diamètre est compris entre 6 et 25 µm pour les amibes libres et 4 à 8 µm pour les oocystes (Certad, 2008; Visvesvara *et al.*, 2007). De plus les amibes libres et les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont tous deux ubiquitaires de l'environnement hydrique.

Nos résultats ont finalement démontré qu'en ce qui concerne la réponse aux traitements chimiques, les sensibilités des espèces d'amibes libres testées étaient différentes de celle de *C. parvum*. Par contre, la réponse aux stress thermiques testés a été équivalente pour *A. castellanii* et *C. parvum*. Il pourrait ainsi être envisagé d'utiliser *A. castellanii* comme modèle pour évaluer la réponse des oocystes de *C. parvum* aux traitements physiques. Les amibes libres sont d'ailleurs déjà utilisées comme modèle dans l'étude de la virulence bactérienne du fait de nombreuses similitudes avec les macrophages (Cosson and Soldati, 2008; Pukatzki *et al.*, 2002; Rémy *et al.*, 2018) ou encore comme outil dans la recherche de nouvelles espèces d'ARB potentiellement pathogènes lié au postulat que les bactéries résistantes aux amibes libres sont susceptibles d'être pathogènes pour l'Homme du fait de leur ressemblance avec les macrophages (Greub and Raoult, 2004; Molmeret *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2010). Pour cela, la co-culture amibienne peut être utilisée. Une fois les différents micro-organismes mis en contact, la présence de bactéries lysant ou envahissant les amibes libres est recherchée microscopiquement, les bactéries sont ensuite identifiées par biologie moléculaire (Tosetti *et al.*, 2014)

La culture de *Cryptosporidium* étant impossible, il est toujours actuellement recherché un modèle d'étude subsidiaire. Des travaux ont ainsi été initiés avec des spores bactériennes anaérobies et aérobies, des algues et des microsphères (Headd and Bradford, 2016). L'utilisation des spores aérobies de *Bacillus subtilis* et des spores de *Clostridium sporogenes* comme modèle a été évaluée dans la résistance au dioxyde de chlore. Il s'est avéré que ces spores n'ont pas pu être utilisées comme indicateurs directs de l'inactivation de *C. parvum* car plus sensibles que *C. parvum* (Chauret *et al.*, 2001; Nieminski *et al.*, 2000; Rice *et al.*, 1996). Dans notre étude, le dioxyde de chlore n'a pas été testé car une concentration élevée de ce désinfectant entraîne la formation de sous-produits toxiques dans l'eau et l'utilisation de fortes concentrations n'est pas recommandée même s'il reste plus efficace que le chlore. Il est d'ailleurs recommandé par l'US-EPA (United States Environmental Protection Agency) d'utiliser des spores de *Bacillus* pour évaluer l'élimination de *Cryptosporidium* par des traitements conventionnels de potabilité d'eau (coagulation, floculation, sédimentation et filtration) (US EPA, 2015). D'autres études ont également essayé d'utiliser des microsphères fluorescentes de taille comparable à celles des oocystes mais plutôt comme modèle pour évaluer l'efficacité des systèmes de filtration (Dai and Hozalski, 2003). En effet, ce type de modèle a l'inconvénient de ne pas être vivant et donc de pouvoir être utilisé uniquement pour évaluer des systèmes de traitement mécanique. Une autre étude a montré que certaines espèces d'algues et notamment *Selenastrum capricornutum* pouvaient être utilisées comme modèle d'élimination des oocystes de *C. parvum* pour la filtration rapide sur sable avec un taux d'abattement comparable d' $1,5 \log_{10}$ (Akiba *et al.*, 2002).

Conclusions et Perspectives

Si de rares études antérieures avaient initié l'évaluation d'interactions entre *C. parvum* et amibes libres, nos travaux ont permis d'actualiser ces données et de les approfondir grâce aux outils technologiques aujourd'hui disponibles. Ce travail a permis de répondre aux différents objectifs initiaux.

Grâce à de nombreuses approches complémentaires de microscopie et de biologie moléculaire, il a pu être mis en évidence la phagocytose occasionnelle des oocystes de *C. parvum* par les amibes libres. Les résultats ont démontré une phagocytose amibienne modérée dépendante des espèces microbiennes en présence. Nous avons d'ailleurs été confrontés dans cette thèse à la difficulté d'approvisionnement en *C. hominis* et les résultats obtenus ont finalement été biaisés par l'utilisation d'une souche ayant perdu son infectiosité. Il serait donc intéressant de compléter cette étude en utilisant des oocystes de *C. hominis* excrétés récemment ainsi que plusieurs souches par espèce étudiée. Il serait également intéressant d'utiliser différentes conditions de biofilm (différentes espèces bactériennes, différents supports...) ou même encore différentes conditions de milieux (température, pH ...) pour évaluer les interactions microbiennes.

Ces travaux de thèse ont également démontré une perte d'infectiosité importante mais temporaire des oocystes de *C. parvum* en contact amibien. Le contact physique entre ces microorganismes était essentiel pour observer cet effet. Cela suggère une adaptation de *C. parvum* aux autres microorganismes en présence et ouvre des perspectives sur la compréhension des mécanismes correspondants. Il serait ainsi intéressant d'identifier les gènes impliqués dans la virulence des oocystes et dans la résistance à la phagocytose amibienne. Il pourrait à terme en résulter le développement de nouvelles options thérapeutiques contre la cryptosporidiose. Pour cela, après mise en contact de *Cryptosporidium* et *A. castellanii*, il faudrait étudier l'expression génétique (protéomique, séquençage génome complet...) de *Cryptosporidium* notamment au moment de la baisse d'infectiosité.

Les résultats ont également démontré une légère prolifération des oocystes en condition biofilm. Cette prolifération ayant déjà été rapportée dans la littérature mais controversée (Koh *et al.*, 2013). Cela pourrait néanmoins expliquer pourquoi les épidémies d'origine hydrique à *Cryptosporidium* sont si fréquentes (s'il y a prolifération des oocystes dans l'eau sous certaines conditions). Pour compléter ces résultats, il serait intéressant d'utiliser plusieurs types de biofilms en faisant varier les souches microbiennes en présence, les stades de maturation du biofilm ou encore les conditions de développement du biofilm comme la température ou encore le pH. Cela permettrait un approfondissement des connaissances sur le comportement de *Cryptosporidium* dans l'environnement pouvant avoir des applications sur sa détection ou encore son élimination. Il pourrait même en résulter des alternatives aux modèles d'études *in vivo* de *Cryptosporidium* aujourd'hui lourds à utiliser.

La dernière partie de cette étude a permis d'étudier l'effet de traitements de désinfection sur le mélange amibes libres et oocystes de *C. parvum*.

Une tendance à une meilleure résistance aux produits de désinfection des oocystes de *C. parvum* a été observée en présence d'amibes libres. Là encore ces résultats suggèrent des interactions microbiennes intéressantes entre *C. parvum* et les autres microorganismes. Une évaluation plus précise serait intéressante en multipliant les conditions d'essais (effet dose, effet temps, effet souche en présence).

Cette étude a également permis de montrer que les traitements physiques (chaleur et congélation) présentaient des effets comparables sur les amibes libres et les oocystes contrairement aux traitements chimiques (Hypochlorite de sodium 36 000 ppm et NaOH 20%). Les amibes libres possédant de nombreuses caractéristiques en commun avec les oocystes, pourraient servir de modèle d'étude et ainsi permettre de prévoir le comportement des oocystes face à différents traitements physiques. Il serait intéressant de confirmer ces résultats en utilisant différentes températures pour évaluer le comportement des différents microorganismes en dehors des températures élevées testées dans cette étude ainsi que d'étudier l'effet des différents traitements selon une cinétique de temps. L'étude en condition biofilm serait également intéressante car les biofilms sont très fréquemment retrouvés dans l'environnement et ont été décrits comme réservoir alimentaire principale des amibes libres mais également comme un moyen de protection des amibes libres contre des traitements de désinfection (Goudot *et al.*, 2014; Srikanth and Berk, 1994). Il a également été montré que les oocystes de *Cryptosporidium parvum* étaient intégrés aux biofilms et que les biofilms semblaient important dans la dissémination et la protection des oocystes dans l'environnement (Lefebvre *et al.*, 2020). Il serait également judicieux d'utiliser différentes souches d'amibes libres, notamment non axénisées ou depuis peu, car les amibes libres cultivées de manière axénique perdent leur capacité de phagocytose, de virulence, d'enkystement (Coulon *et al.*, 2010 ; Köhler *et al.*, 2008 ; Pumidonming *et al.*, 2010). Il pourrait en résulter une recommandation précise d'un modèle d'étude facile à utiliser et non infectieux vis à vis de la réponse de *Cryptosporidium* aux traitements physiques.

Bibliographie

A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse - E. E. Tyzzer, 1907 [WWW Document], n.d. URL <https://journals.sagepub.com/doi/10.3181/00379727-5-5> (accessed 9.14.21).

Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G., Forsman, M., 2003. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 600–606. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.600-606.2003>

Abedkhozasteh, H., Niyyati, M., Rahimi, F., Heidari, M., Farnia, S., Rezaeian, M., 2013. First Report of *Hartmannella keratitis* in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iran. J. Parasitol.* 8, 481–485.

Åberg, R., Sjöman, M., Hemminki, K., Pirnes, A., Räsänen, S., Kalanti, A., Pohjanvirta, T., Caccio, S.M., Pihlajasaari, A., Toikkanen, S., Huusko, S., Rimhanen-Finne, R., 2015. *Cryptosporidium parvum* Caused a Large Outbreak Linked to Frisée Salad in Finland, 2012. *Zoonoses Public Health* 62, 618–624. <https://doi.org/10.1111/zph.12190>

Adékambi, T., Reynaud-Gaubert, M., Greub, G., Gevaudan, M.-J., La Scola, B., Raoult, D., Drancourt, M., 2004. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5493–5501. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5493-5501.2004>

Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M.W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A.A., Hoppenrath, M., James, T.Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D.J.G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., Mann, D.G., Massana, R., Mitchell, E.A.D., Morrow, C., Park, J.S., Pawlowski, J.W., Powell, M.J., Richter, D.J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F.W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., Zhang, Q., 2019. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>

Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G.B., Archibald, J.M., Anderson, O.Roger., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C.E., Lodge, D.J., Mann, D.G., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Smirnov, A.V., Spiegel, F., 2007. Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Syst. Biol.* 56, 684–689. <https://doi.org/10.1080/10635150701494127>

Afssa, 2002. Rapport sur les infections à protozoaires liées aux aliments et à l’eau: évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* sp. Maisons-Alfort.

Ahmed Khan, N., 2011. The Neuropathogenesis of *Acanthamoeba* encephalitis: Barriers to Overcome. *J. Cell Sci. Ther.* 2. <https://doi.org/10.4172/2157-7013.S3-001>

Akiba, M., Kunikane, S., Kim, H.-S., Kitazawa, H., 2002. Algae as surrogate indices for the removal of *Cryptosporidium* oocysts by direct filtration. *Water Supply* 2, 73–80. <https://doi.org/10.2166/ws.2002.0087>

Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H., 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J. Parasitol.* 88, 621–623. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0621:ROACCT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0621:ROACCT]2.0.CO;2)

Alsam, S., Jeong, S.R., Sissons, J., Dudley, R., Kim, K.S., Khan, N.A., 2006. *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications. *J. Med. Microbiol.* 55, 689–694. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46497-0>

Amadi, B., Mwiya, M., Musuku, J., Watuka, A., Sianongo, S., Ayoub, A., Kelly, P., 2002. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 360, 1375–1380. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11401-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11401-2)

Anderson, I.J., Watkins, R.F., Samuelson, J., Spencer, D.F., Majoros, W.H., Gray, M.W., Loftus, B.J., 2005. Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. *Protist* 156, 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.04.001>

Anses, 2019. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : “*Cryptosporidium* spp.” - Décembre 2019 | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [WWW Document]. URL <https://www.anses.fr/fr/content/fiche-de-description-de-danger-biologique-transmissible-par-les-aliments-cryptosporidium-s-0> (accessed 11.5.21).

Armon, R., Cheruti, U., 2011. Environmental Aspects of Zoonotic Diseases, in: *Water Intelligence Online*. <https://doi.org/10.2166/9781780500761>

Armon, R., Gold, D., Zuckerman, U., 2016. Environmental Aspects of *Cryptosporidium* 7. Ashigbie, P.G., Shepherd, S., Steiner, K.L., Amadi, B., Aziz, N., Manjunatha, U.H., Spector, J.M., Diagana, T.T., Kelly, P., 2021. Use-case scenarios for an anti-*Cryptosporidium* therapeutic. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009057. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009057>

Atwill, E.R., Tate, K.W., Pereira, M.D.G.C., Bartolome, J., Nader, G., 2006. Efficacy of natural grassland buffers for removal of *Cryptosporidium parvum* in rangeland runoff. *J. Food Prot.* 69, 177–184. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.1.177>

Augustus Iohannes Roesel von Rosenhof, 1755. *Historia Polyporum* from *Insecten-Belustigung*, 1746-1761.

Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 45, 6603–6614. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>

Balthazard-Accou, K., Emmanuel, E., Diouf, M., Agnamey, P., 2017. Microbiological contamination of groundwater by *Cryptosporidium* oocysts in Haiti. Health risk assessment for population. *Aqua-LAC* 9, 51–63.

Barker, J., Scaife, H., Brown, M.R., 1995. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2684–2688. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.12.2684>

Barnett, N.D., Kaplan, A.M., Hopkin, R.J., Saubolle, M.A., Rudinsky, M.F., 1996. Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri*: clinical review. *Pediatr. Neurol.* 15, 230–234. [https://doi.org/10.1016/s0887-8994\(96\)00173-7](https://doi.org/10.1016/s0887-8994(96)00173-7)

Barta, J.R., Thompson, R.C.A., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol.* 22, 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.001>

Behera, H., Satpathy, G., Tripathi, M., 2016. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba meningitis/ meningoencephalitis* (AME) patients in India. *Parasit. Vectors* 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1729-5>

Benamrouz-Vanneste, S., Sawant, M., Benamrouz, S., Chabé, M., Guyot, K., Costa, D., Favennec, L., Gargala, G., Viscogliosi, E., Certad, G., 2020a. La cryptosporidiose et son impact en santé publique. *Rev. Biol. Médicale*.

Benamrouz-Vanneste, S., Sawant, M., Benamrouz, S., Chabé, M., Guyot, K., Costa, D., Favennec, L., Gargala, G., Viscogliosi, E., Certad, G., 2020b. La cryptosporidiose et son impact en santé publique. *Rev. Biol. Médicale*.

Bertelli, C., Greub, G., 2012. Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 110. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00110>

Best, A., Abu Kwaik, Y., 2018. Evolution of the Arsenal of *Legionella pneumophila* Effectors To Modulate Protist Hosts. *mBio* 9, e01313-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01313-18>

Betancourt, W.Q., Rose, J.B., 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol., Waterborne Zoonotic Parasites* 126, 219–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.002>

Bloch, K.C., Schuster, F.L., 2005. Inability To Make a Premortem Diagnosis of *Acanthamoeba* Species Infection in a Patient with Fatal Granulomatous Amebic Encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3003–3006. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.3003-3006.2005>

Bolivar, I., Fahrni, J.F., Smirnov, A., Pawlowski, J., 2001. SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2306–2314. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003777>

Bones, A.J., Jossé, L., More, C., Miller, C.N., Michaelis, M., Tsaousis, A.D., 2019. Past and future trends of *Cryptosporidium* in vitro research. *Exp. Parasitol.* 196, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.001>

Bonkowski, M., Clarholm, M., 2012. Stimulation of Plant Growth through Interactions of Bacteria and Protozoa: Testing the Auxiliary Microbial Loop Hypothesis. *Acta Protozool.* 51, 237–247.

Bonnin, A., Kapel, N., Favennec, L., Gargala, G., L'Ollivier, C., Dalle, F., 2012. *Cryptosporidium* spp. et cryptosporidiose. *EMC - Biol. Médicale* 7, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S2211-9698\(12\)57771-X](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(12)57771-X)

Bornier, F., Zas, E., Potheret, D., Laaberki, M.-H., Coupât-Goutaland, B., Charpentier, X., 2021. Environmental Free-Living Amoebae Can Predate on Diverse Antibiotic-Resistant Human Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e00747-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00747-21>

Bory de Saint-Vincent, Bory de Saint-Vincent, Lamarck, J.-B., 1826. *Essai d'une classification des animaux microscopiques* / par M. Bory de St-Vincent. Veuve Agasse, Paris :

Bottone, E.J., 1993. Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 60, 260–270.

Bourdais-Massenet, D., Polack, Bruno, Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC), École nationale vétérinaire d'Alfort, 2008. *Etude de la prévalence de la cryptosporidiose en élevage canin*. [s.n.], S.l.

Bouyer, S., 2008. *Différenciation d'Acanthamoeba castellanii et rôle dans l'interaction avec Legionella pneumophila* (These de doctorat). Poitiers.

- Bouzid, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., 2013. Cryptosporidium Pathogenicity and Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 115–134. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-12>
- Bowers, B., 1977. Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell Res.* 110, 409–417. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90307-x](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90307-x)
- Bowers, B., Korn, E.D., 1969. THE FINE STRUCTURE OF ACANTHAMOEBA CASTELLANII (NEFF STRAIN). *J. Cell Biol.* 41, 786–805.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Brindley, N., Matin, A., Khan, N.A., 2009. *Acanthamoeba castellanii*: High antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Exp. Parasitol.* 121, 254–256. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.11.009>
- Brown, M.W., Silberman, J.D., Spiegel, F.W., 2011. “Slime molds” among the Tubulinea (Amoebozoa): molecular systematics and taxonomy of Copromyxa. *Protist* 162, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.09.003>
- Budu-Amoako, E., Greenwood, S.J., Dixon, B.R., Sweet, L., Ang, L., Barkema, H.W., McClure, J.T., 2012. Molecular Epidemiology of Cryptosporidium and Giardia in Humans on Prince Edward Island, Canada: Evidence of Zoonotic Transmission From Cattle. *Zoonoses Public Health* 59, 424–433. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01474.x>
- Butt, C.G., 1966. Primary amebic meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* 274, 1473–1476. <https://doi.org/10.1056/NEJM196606302742605>
- Butt, C.G., Baro, C., Knorr, R.W., 1968. Naegleria (sp.) identified in amebic encephalitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 50, 568–574. <https://doi.org/10.1093/ajcp/50.5.568>
- Byers, T.J., 1979. Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. *Int. Rev. Cytol.* 61, 283–338. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62000-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62000-8)
- Cacciò, S.M., 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia* 47, 185–192.
- Cacciò, S.M., Chalmers, R.M., 2016. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 471–480. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.021>
- Cacciò, S.M., Pozio, E., 2006. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 4, 429–443. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.3.429>
- 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. <https://doi.org/10.3201/eid1206.060015>
- Canada, S., 2005. Protozoaires entériques : Giardia et Cryptosporidium [WWW Document]. URL <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/qualite-eau/protozoaires-enteriques-giardia-cryptosporidium.html> (accessed 9.7.21).
- Capewell, L.G., Harris, A.M., Yoder, J.S., Cope, J.R., Eddy, B.A., Roy, S.L., Visvesvara, G.S., Fox, L.M., Beach, M.J., 2015. Diagnosis, Clinical Course, and Treatment of Primary Amoebic Meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 4, e68-75. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu103>

Carey, C.M., Lee, H., Trevors, J.T., 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 38, 818–862. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.012>

Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., Rodier, M.H., 2014. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J. Hosp. Infect.* 87, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.001>

Cateau, Estelle, Héchard, Y., Rodier, M.-H., 2014. Les amibes libres: un danger méconnu. *Rev. Francoph. Lab., Micro-organismes pathogènes de l'eau* (2) 2014, 41–51. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72404-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72404-9)

Cateau, E., Imbert, C., Rodier, M.-H., 2008. *Hartmanella vermiformis* can be permissive for *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 475–477. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02457.x>

Caumo, K., Frasson, A.P., Pens, C.J., Panatieri, L.F., Frazzon, A.P.G., Rott, M.B., 2009. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 477–485. <https://doi.org/10.1179/136485909X451825>

Cavalier-Smith, T., 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *Eur. J. Protistol.* 50, 472–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.07.002>

CDC, 2011. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water United States, 2007-2008 and surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water. United States, 2007-2008. *MMWR* 2011;60(No. RR-12):1-75.

Centers for Disease Control (CDC), 1987. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. Council of State and Territorial Epidemiologists; AIDS Program, Center for Infectious Diseases. *MMWR Suppl.* 36, 1S-15S.

Certad, G., 2008. 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 (phdthesis). Université du Droit et de la Santé - Lille II.

Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Canals, O., Salvadó, H., Araujo, R.M., 2014. Effect of thermal treatment on free-living amoeba inactivation. *J. Appl. Microbiol.* 116, 728–736. <https://doi.org/10.1111/jam.12379>

Cervia, J.S., Ortolano, G.A., Canonica, F.P., 2008. Hospital tap water: A reservoir of risk for health care-associated infection. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 16, 349–353. <https://doi.org/10.1097/IPC.0b013e318181fa5e>

Chalmers, R.M., 2014a. *Cryptosporidium*, in: *Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier, pp. 287–326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00016-0>

Chalmers, R.M., 2014b. Chapter Fourteen - *Acanthamoeba*, in: Percival, S.L., Yates, M.V., Williams, D.W., Chalmers, R.M., Gray, N.F. (Eds.), *Microbiology of Waterborne Diseases* (Second Edition). Academic Press, London, pp. 263–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00014-7>

Chalmers, R.M., 2012. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48, 429–446. https://doi.org/10.4415/ANN_12_04_10

Chalmers, R.M., Davies, A.P., 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 124, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003>

Chalmers, R.M., Robinson, G., Elwin, K., Elson, R., 2019. Analysis of the *Cryptosporidium* spp. and gp60 subtypes linked to human outbreaks of cryptosporidiosis in England and Wales, 2009 to 2017. *Parasit. Vectors* 12, 95. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3354-6>

Chang, P.C., Soong, H.K., 1991. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 109, 463–464. <https://doi.org/10.1001/archoph.1991.01080040023004>

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.

Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Sterling, C.R., Wang, C., Jakubowski, W., Dupont, H.L., 1999. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 157–164. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.157>

Chauret, C.P., Radziminski, C.Z., Lepuil, M., Creason, R., Andrews, R.C., 2001. Chlorine Dioxide Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts and Bacterial Spore Indicators. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2993–3001. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2993-3001.2001>

Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., Lagunes-Guillén, A., Omaña-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 2013. *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol. Res.* 112, 1125–1130. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3261-7>

Chrisman, C.J., Albuquerque, P., Guimaraes, A.J., Nieves, E., Casadevall, A., 2011. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. *PLoS Pathog.* 7, e1002047. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002047>

Chyzheuskaya, A., Cormican, M., Srivinas, R., O'Donovan, D., Prendergast, M., O'Donoghue, C., Morris, D., 2017. Economic Assessment of Waterborne Outbreak of Cryptosporidiosis. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1650–1656. <https://doi.org/10.3201/eid2310.152037>

Circulaire DHOS/E4/DGS/SD7A n° 2005-417 du 9 septembre 2005 relative au guide technique sur l'eau dans les établissements de santé - APHP DAJDP [WWW Document], n.d. URL <http://affairesjuridiques.aphp.fr/textes/circulaire-dhose4dgsd7a-n-2005-417-du-9-septembre-2005-relative-au-guide-technique-sur-leau-dans-les-etablissements-de-sante/> (accessed 2.8.22).

Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 62, 3254–3261.

Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E., 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* 65, 3759–3767.

Clarke, B., Sinha, A., Parmar, D.N., Sykakis, E., 2012. Advances in the Diagnosis and Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. *J. Ophthalmol.* 2012, 484892. <https://doi.org/10.1155/2012/484892>

Coburn, J., Frank, D.W., 1999. Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect. Immun.* 67, 3151–3154. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.3151-3154.1999>

Coelho, F.J.R.C., Louvado, A., Domingues, P.M., Cleary, D.F.R., Ferreira, M., Almeida, A., Cunha, M.R., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., 2016. Integrated analysis of bacterial and microeukaryotic communities from differentially active mud volcanoes in the Gulf of Cadiz. *Sci. Rep.* 6, 35272. <https://doi.org/10.1038/srep35272>

Collingro, A., Poppert, S., Heinz, E., Schmitz-Esser, S., Essig, A., Schweikert, M., Wagner, M., Horn, M., 2005. Recovery of an environmental *Chlamydia* strain from activated sludge by co-cultivation with *Acanthamoeba* sp. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 301–309. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27406-0>

Connelly, L., Craig, B.H., Jones, B., Alexander, C.L., 2013. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of Soay Sheep on St. Kilda Islands, Scotland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2240–2246. <https://doi.org/10.1128/AEM.02823-12>

Cook, N., Paton, C.A., Wilkinson, N., Nichols, R. a. B., Barker, K., Smith, H.V., 2006. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: development and optimization of methods. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.015>

Cordell, R.L., Addiss, D.G., 1994. Cryptosporidiosis in child care settings: a review of the literature and recommendations for prevention and control. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13, 310–317.

Cordingley, J.S., Wills, R.A., Villemez, C.L., 1996. Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *J. Cell. Biochem.* 61, 167–171. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19960501\)61:2%3C167::AID-JCB1%3E3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19960501)61:2%3C167::AID-JCB1%3E3.0.CO;2-S)

Corsaro, D., Greub, G., 2006. Pathogenic potential of novel *Chlamydiae* and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 283–297. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.283-297.2006>

Corso, P.S., Kramer, M.H., Blair, K.A., Addiss, D.G., Davis, J.P., Haddix, A.C., 2003. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 426–431. <https://doi.org/10.3201/eid0904.020417>

Cosson, P., Soldati, T., 2008. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.005>

Costa, D., Razakandrainibe, R., Valot, S., Vannier, M., Sautour, M., Basmaciyan, L., Gargala, G., Viller, V., Lemeteil, D., Ballet, J.-J., Dalle, F., Favennec, L., 2020. Epidemiology of *Cryptosporidiosis* in France from 2017 to 2019. *Microorganisms* 8, 1358. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091358>

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994>
Coulon, C., 2011. Amibes libres de l'environnement: résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les *Chlamydiales* (These de doctorat). Paris 11.

Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2010. Resistance of Acanthamoeba Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2689–2697. <https://doi.org/10.1128/JCM.00309-10>

Coulon, C., Dechamps, N., Meylheuc, T., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2012. The Effect of In Vitro Growth Conditions on the Resistance of Acanthamoeba Cysts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 198–205. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00612.x>

Culbertson, C.G., Smith, J.W., Cohen, H.K., Minner, J.R., 1959. Experimental Infection of Mice and Monkeys by Acanthamoeba. *Am. J. Pathol.* 35, 185–197.

Culbertson, C.G., Smith, J.W., Minner, J.R., 1958. Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity. *Science* 127, 1506. <https://doi.org/10.1126/science.127.3313.1506>

Current, W.L., Garcia, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 325–358. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.3.325>

Cursons, R.T., Brown, T.J., Keys, E.A., 1980. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 62–66. <https://doi.org/10.1128/aem.40.1.62-66.1980>

Dai, X., Boll, J., 2003. Evaluation of attachment of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to soil particles. *J. Environ. Qual.* 32, 296–304. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.2960>

Dai, X., Hozalski, R.M., 2003. Evaluation of Microspheres as Surrogates for *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Filtration Experiments. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1037–1042. <https://doi.org/10.1021/es025521w>

D'Antonio, R.G., Winn, R.E., Taylor, J.P., Gustafson, T.L., Current, W.L., Rhodes, M.M., Gary, G.W., Zajac, R.A., 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann. Intern. Med.* 103, 886–888. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-6-886>

Daraei, H., Oliveri Conti, G., Sahlabadi, F., Thai, V.N., Gholipour, S., Turki, H., Fakhri, Y., Ferrante, M., Moradi, A., Mousavi Khaneghah, A., 2021. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in water: a global systematic review and meta-analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 9498–9507. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11261-6>

Daraei, H., Oliveri Conti, G., Sahlabadi, F., Thai, V.N., Gholipour, S., Turki, H., Fakhri, Y., Ferrante, M., Moradi, A., Mousavi Khaneghah, A., 2020. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in water: a global systematic review and meta-analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11261-6>

Davies, A.P., Chalmers, R.M., 2009. Cryptosporidiosis. *BMJ* 339, b4168. <https://doi.org/10.1136/bmj.b4168>

Davies, C.M., Altavilla, N., Krogh, M., Ferguson, C.M., Deere, D.A., Ashbolt, N.J., 2005. Environmental inactivation of *Cryptosporidium* oocysts in catchment soils. *J. Appl. Microbiol.* 98, 308–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02459.x>

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. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00076-4](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00076-4)

De Jonckheere, J.F., Brown, S., 1998. There is no evidence that the free-living amoeba *Hartmannella* is a human parasite. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 26, 773. <https://doi.org/10.1086/514581>

de Moraes, J., Alfieri, S.C., 2008. Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 221–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00594.x>

Decker, B.K., Palmore, T.N., 2013. The role of water in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26, 345–351. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630adf>

Delafont, V., 2015. Diversité et implication des amibes libres dans la survie et la persistance des mycobactéries non tuberculeuses au sein d'un réseau d'eau potable (These de doctorat). Poitiers.

Delafont, V., 2006. Diversité et implication des amibes libres dans la survie et la persistance des mycobactéries non tuberculeuses au sein d'un réseau d'eau potable 261.

Delafont, V., Rodier, M.-H., Maisonneuve, E., Cateau, E., 2018. *Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest. *Microb. Ecol.* 76, 991–1001. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1199-8>

Delaunay, A., Gargala, G., Li, X., Favennec, L., Ballet, J.J., 2000. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4315–4317. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4315-4317.2000>

Denet, E., Coupat-Goutaland, B., Nazaret, S., Pélandakis, M., Favre-Bonté, S., 2017. Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitol. Res.* 116, 3151–3162. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5632-6>

Deng, M.Q., Cliver, D.O., 1999. *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 113–121. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00187-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00187-1)

Di Giovanni, G.D., Hashemi, F.H., Shaw, N.J., Abrams, F.A., LeChevallier, M.W., Abbaszadegan, M., 1999. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3427–3432. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3427-3432.1999>

Divoux, E., Szajner, S., Moal, G.L., Venisse, N., Faucher-Grassin, J., Dupuis, A., 2016. Mise au point sur le traitement de la cryptosporidiose : intérêt du nitazoxanide Focus on cryptosporidiosis treatment: place of nitazoxanid. undefined.

Domenico, P., Salo, R.J., Cross, A.S., Cunha, B.A., 1994. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 62, 4495–4499.

Dong, S., Yang, Ya, Wang, Y., Yang, D., Yang, Yu, Shi, Y., Li, C., Li, L., Chen, Y., Jiang, Q., Zhou, Y., 2020. Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitol.* 65, 882–889. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00230-1>

Drozański, W., Drozańska, D., Wicińska, M., 1984. The cell wall of the obligate intracellular bacterial parasite of small free-living amoebae. I. Morphology and chemical composition of the rigid layer and peptidoglycan. *Acta Microbiol. Pol.* 33, 195–206.

Drozd, C., n.d. Comportement de *Cryptosporidium* spp. dans l'eau: conséquences au niveau de la microfiltration tangentielle 265.

Dudley, R., Matin, A., Alsam, S., Sissons, J., Maghsood, A.H., Khan, N.A., 2005. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Trop.* 95, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.05.004>

Dumoulin, A., Guyot, K., Lelièvre, E., Dei-Cas, E., Cailliez, J.C., 2000. [Cryptosporidium and wildlife: a risk for humans?]. *Parasite Paris Fr.* 7, 167–172. <https://doi.org/10.1051/parasite/2000073167>

DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1995. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332, 855–859. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321304>

Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M.-H., Soreau, S., Héchard, Y., 2014. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007>

ECDC, 2019. Cryptosporidiosis - Annual Epidemiological Report for 2018 [WWW Document]. URL <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/cryptosporidiosis-annual-epidemiological-report-2018> (accessed 11.3.21).

Efstratiou, A., Ongerth, J., Karanis, P., 2017. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Res.* 123, 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>

Ehsan, M.A., Akter, M., Ahammed, M., Ali, M.A., Ahmed, M.U., 2017. PREVALENCE AND CLINICAL IMPORTANCE OF CRYPTOSPORIDIUM AND GIARDIA IN HUMAN AND ANIMALS. *Bangladesh J. Vet. Med.* 14, 109–122. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v14i2.31376>

El-Etr, S.H., Margolis, J.J., Monack, D., Robison, R.A., Cohen, M., Moore, E., Rasley, A., 2009. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7488–7500. <https://doi.org/10.1128/AEM.01829-09>

Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiol. Infect.* 140, 673–683. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000860>

Espeland, E.M., Wetzel, R.G., 2001. Effects of Photosynthesis on Bacterial Phosphatase Production in Biofilms. *Microb. Ecol.* 42, 328–337. <https://doi.org/10.1007/s002480000117>

Ettinger, M.R., Webb, S.R., Harris, S.A., McIninch, S.P., C Garman, G., Brown, B.L., 2003. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol. Res.* 89, 6–15. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0707-3>

Euzéby, J., 2002. Sur l'épidémiologie de la cryptosporidiose humaine – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. URL <https://www.academie-medecine.fr/sur-lepidemiologie-de-la-cryptosporidiose-humaine/> (accessed 9.15.22).

Fabros, M.R.L., Diesta, X.R.S., Oronan, J.A., Verdejo, K.S., Garcia, J.-A.S.M., Sophia Romey, Ma., Milanez, G.D.J., 2021. Current report on the prevalence of free-living amoebae (FLA) in natural hot springs: a systematic review. *J. Water Health* 19, 563–574. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.101>

FAO/OMS, 2014. Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. Microbiological Risk Assessment Series (MRA) 23 [WWW Document]. URL <https://www.fao.org/publications/card/fr/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/> (accessed 2.14.22).

Fayer, R., 2004. Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126, 37–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.004>

Fayer, R., 1995. Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 844–846.

Fayer, R., 1994. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2732–2735. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2732-2735.1994>

Fayer, R., Graczyk, T.K., Lewis, E.J., Trout, J.M., Farley, C.A., 1998a. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1070–1074. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.3.1070-1074.1998>

Fayer, Ronald, Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30, 1305–1322. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00135-1)

Fayer, R., Nerad, T., 1996. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1431–1433. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1431-1433.1996>

Fayer, R., Orlandi, P., Perdue, M.L., 2009. Virulence factor activity relationships for hepatitis E and *Cryptosporidium*. *J. Water Health* 7 Suppl 1, S55-63. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.044>

Fayer, R., Trout, J.M., Jenkins, M.C., 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84, 1165–1169.

Fayer, R., Trout, J.M., Walsh, E., Cole, R., 2000. Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 161–163. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00026.x>

Feng, Y., Ryan, U.M., Xiao, L., 2018. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol.* 34, 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.009>

Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>

Finch, G.R., Black, E.K., Gyürék, L., Belosevic, M., 1993. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4203–4210. <https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4203-4210.1993>

Florescu, D.F., Sandkovsky, U., 2016. *Cryptosporidium* infection in solid organ transplantation. *World J. Transplant.* 6, 460–471. <https://doi.org/10.5500/wjt.v6.i3.460>

Fouque, E., 2013. Les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre *Vermamoeba vermiformis* (These de doctorat). Poitiers.

Fouque, E., Héchard, Y., Hartemann, P., Humeau, P., Trouilhé, M.-C., 2014. Sensitivity of *Vermamoeba* (*Hartmannella*) *vermiformis* cysts to conventional disinfectants and protease. *J. Water Health* 13, 302–310. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.154>

Fouque, E., Trouilhé, M.-C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.-H., Héchard, Y., 2012. Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. *Eukaryot. Cell* 11, 382–387. <https://doi.org/10.1128/EC.05301-11>

Fouque, E., Yefimova, M., Trouilhé, M.-C., Quellard, N., Fernandez, B., Rodier, M.-H., Thomas, V., Humeau, P., Héchard, Y., 2015. Morphological Study of the Encystment and Excystment of *Vermamoeba vermiformis* Revealed Original Traits. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62, 327–337. <https://doi.org/10.1111/jeu.12185>

Fowler, M., Carter, R.F., 1965. Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to *Acanthamoeba* sp.: a Preliminary Report. *Br. Med. J.* 2, 734.2-742.

Freije, M.R., 2005. Formulating a risk reduction strategy for waterborne pathogens in hospital water systems. *Am. J. Infect. Control* 33, S50–S53. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.04.004>

Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S., Welch, M., Spring, D.R., 2012. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 20, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.003>

García-Aljaro, C., Blanch, A.R., Campos, C., Jofre, J., Lucena, F., 2019. Pathogens, faecal indicators and human-specific microbial source-tracking markers in sewage. *J. Appl. Microbiol.* 126, 701–717. <https://doi.org/10.1111/jam.14112>

Gargala, G., Delaunay, A., Li, X., Brasseur, P., Favennec, L., Ballet, J.J., 2000. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 57–60. <https://doi.org/10.1093/jac/46.1.57>

Garner, A., 1993. Pathogenesis of acanthamoebic keratitis: hypothesis based on a histological analysis of 30 cases. *Br. J. Ophthalmol.* 77, 366–370. <https://doi.org/10.1136/bjo.77.6.366>

GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators, 2018. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* 18, 1211–1228. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)

Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., Sbhatu, D.B., 2019. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 5, e02192. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02192>

Geisen, S., Rosengarten, J., Koller, R., Mulder, C., Urich, T., Bonkowski, M., 2015. Pack hunting by a common soil amoeba on nematodes. *Environ. Microbiol.* 17, 4538–4546. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12949>

- Gertler, M., Dürr, M., Renner, P., Poppert, S., Askar, M., Breidenbach, J., Frank, C., Preußel, K., Schielke, A., Werber, D., Chalmers, R., Robinson, G., Feuerpfeil, I., Tannich, E., Gröger, C., Stark, K., Wilking, H., 2015. Outbreak of *Cryptosporidium hominis* following river flooding in the city of Halle (Saale), Germany, August 2013. *BMC Infect. Dis.* 15, 88. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0807-1>
- Geurden, T., Levecke, B., Cacció, S.M., Visser, A., De Groote, G., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2009. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology* 136, 1161–1168. <https://doi.org/10.1017/S003118200990436>
- Gharpure, R., 2019. Cryptosporidiosis Outbreaks — United States, 2009–2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6825a3>
- Goh, S., Reacher, M., Casemore, D.P., Verlander, N.Q., Chalmers, R., Knowles, M., Williams, J., Osborn, K., Richards, S., 2004. Sporadic Cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1007–1015. <https://doi.org/10.3201/10.3201/eid1006.030325>
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martínez-Urtaza, J., García-Martín, O., Ares-Mazás, M.E., 2003. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 97–105. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00057-6)
- Gómez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E., Ares-Mazás, E., 2007. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.* 100, 1151–1154. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0377-7>
- Goudot, S., Herbelin, P., Mathieu, L., Soreau, S., Banas, S., Jorand, F.P.A., 2014. Biocidal efficacy of monochloramine against planktonic and biofilm-associated *Naegleria fowleri* cells. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1055–1065. <https://doi.org/10.1111/jam.12429>
- Graczyk, T.K., Schwab, K.J., 2000. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2, 305–309. <https://doi.org/10.1007/s11894-000-0023-y>
- Greub, G., Raoult, D., 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 413–433. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
- Greub, G., Raoult, D., 2002. Crescent bodies of *Parachlamydia acanthamoeba* and its life cycle within *Acanthamoeba polyphaga*: an electron micrograph study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3076–3084. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3076-3084.2002>
- Guérin, A., Striepen, B., 2020. The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite *Cryptosporidium*. *Cell Host Microbe* 28, 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.007>
- Guerrant, R.L., 1997. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 51–57. <https://doi.org/10.3201/eid0301.970106>
- Gueudry, J., Le Goff, L., Compagnon, P., Lefevre, S., Colasse, E., Aknine, C., Duval, F., François, A., Razakandrainibe, R., Ballet, J.J., Muraine, M., Favennec, L., 2018. Evaluation of voriconazole anti-*Acanthamoeba polyphaga* in vitro activity, rat cornea penetration and efficacy against experimental rat *Acanthamoeba* keratitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1895–1898. <https://doi.org/10.1093/jac/dky094>
- Guyot, K., Sarfati, C., Derouin, F., 2012. Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose. *Feuill. DeBiologie* 9.

- Hadaś, E., Derda, M., Cholewiński, M., 2017. Evaluation of the effectiveness of tea tree oil in treatment of *Acanthamoeba* infection. *Parasitol. Res.* 116, 997–1001. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5377-2>
- Han, X., Wang, X., 2021. Opportunities and Challenges in Tunneling Nanotubes Research: How Far from Clinical Application? *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2306. <https://doi.org/10.3390/ijms22052306>
- Haque, R., Mondal, D., Kirkpatrick, B.D., Akther, S., Farr, B.M., Sack, R.B., Petri, W.A., 2003. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 398–405.
- Hashim, A., Mulcahy, G., Bourke, B., Clyne, M., 2006. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with Primary Human and Bovine Intestinal Cells. *Infect. Immun.* 74, 99–107. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.99-107.2006>
- Hatam-Nahavandi, K., Ahmadpour, E., Carmena, D., Spotin, A., Bangoura, B., Xiao, L., 2019. *Cryptosporidium* infections in terrestrial ungulates with focus on livestock: a systematic review and meta-analysis. *Parasit. Vectors* 12, 453. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3704-4>
- Headd, B., Bradford, S.A., 2016. Use of aerobic spores as a surrogate for *cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies. *Water Res.* 90, 185–202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.024>
- Heaselgrave, W., Patel, N., Kilvington, S., Kehoe, S.C., McGuigan, K.G., 2006. Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water - a laboratory study using simulated sunlight. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 125–130. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01940.x>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00212-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00212-0)
- Hijnen, W. a. M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* 40, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030>
- Hoffmann, R., Michel, R., 2001. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 215–219. [https://doi.org/10.1078/S1438-4639\(04\)70031-0](https://doi.org/10.1078/S1438-4639(04)70031-0)
- Hohweyer, J., Cazeaux, C., Travailé, E., Languet, E., Dumètre, A., Aubert, D., Terryn, C., Dubey, J.P., Azas, N., Houssin, M., Loïc, F., Villena, I., La Carbona, S., 2016. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.* 57, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.002>
- Howe, A.D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K.S., Wright, P., Hunter, P.R., 2002. *Cryptosporidium* Oocysts in a Water Supply Associated with a *Cryptosporidiosis* Outbreak. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 619–624. <https://doi.org/10.3201/eid0806.010271>
- Huamanchay, O., Genzlinger, L., Iglesias, M., Ortega, Y.R., 2004. Ingestion of *Cryptosporidium* oocysts by *Caenorhabditis elegans*. *J. Parasitol.* 90, 1176–1178. <https://doi.org/10.1645/GE-253R>
- Hubber, A., Roy, C.R., 2010. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 261–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104034>

Hubert, F., Rodier, M.-H., Minoza, A., Portet-Sulla, V., Cateau, E., Brunet, K., 2021. Free-living amoebae promote *Candida auris* survival and proliferation in water. *Lett. Appl. Microbiol.* 72, 82–89. <https://doi.org/10.1111/lam.13395>

Hughes, R., Heaselgrave, W., Kilvington, S., 2003. *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3080–3084. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3080-3084.2003>
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. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 39, 504–510. <https://doi.org/10.1086/422649>

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, A., Avery, S.M., 2005. Declines of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *J. Appl. Microbiol.* 99, 58–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02585.x>

Ikiroma, I.A., Pollock, K.G., 2021. Influence of weather and climate on cryptosporidiosis—A review. *Zoonoses Public Health* 68, 285–298. <https://doi.org/10.1111/zph.12785>

Innes, E.A., Chalmers, R.M., Wells, B., Pawlowic, M.C., 2020. A One Health Approach to Tackle Cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 36, 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.016>

Iturriaga, R., Zhang, S., Sonek, G.J., Stibbs, H., 2001. Detection of respiratory enzyme activity in *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts using redox dyes and immunofluorescence techniques. *J. Microbiol. Methods* 46, 19–28. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00249-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00249-4)

Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J., Greub, G., 2013. Discovery of New Intracellular Pathogens by Amoebal Coculture and Amoebal Enrichment Approaches. *J. Vis. Exp. JoVE* 51055. <https://doi.org/10.3791/51055>

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M.A., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc. J. CMA* 81, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

Jenkins, M., Bowman, D., Fogarty, E., Ghiorse, W., 2002. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1101–1109. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00046-9)

Jenkins, M., Trout, J.M., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., Fayer, R., 2003. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol. Res.* 89, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0720-6>

Jenkins, M.B., Anguish, L.J., Bowman, D.D., Walker, M.J., Ghiorse, W.C., 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3844–3850.

Jenkins, M.B., Bowman, D.D., Ghiorse, W.C., 1998. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 784–788. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.784-788.1998>
John, D.T., Howard, M.J., 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol. Res.* 81, 193–201. <https://doi.org/10.1007/BF00937109>

- Johnson, D.C., Enriquez, C.E., Pepper, I.L., Davis, T.L., Gerba, C.P., Rose, J.B., 1997. Survival of Giardia, Cryptosporidium, poliovirus and Salmonella in marine waters. Water Sci. Technol., Health-Related Water Microbiology 1996 35, 261–268. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00270-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00270-9)
- Jolivet-Gougeon, A., Bonnaure-Mallet, M., 2014. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. Drug Discov. Today Technol. 11, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.003>
- Jones, B.R., McGill, J.I., Steele, A.D., 1975. Recurrent suppurative kerato-uveitis with loss of eye due to infection by Acanthamoeba castellanii. Trans. Ophthalmol. Soc. U. K. 95, 210–213.
- Joslin, C.E., Tu, E.Y., McMahon, T.T., Passaro, D.J., Stayner, L.T., Sugar, J., 2006. Epidemiological Characteristics of a Chicago-area Acanthamoeba Keratitis Outbreak. Am. J. Ophthalmol. 142, 212–217.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2006.04.034>
- Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M., Friedman, M.G., 2001. Infection of Acanthamoeba polyphaga with Simkania negevensis and S. negevensis Survival within Amoebal Cysts. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4789–4795. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4789-4795.2001>
- Kato, S., Jenkins, M.B., Fogarty, E.A., Bowman, D.D., 2002. EFFECTS OF FREEZE–THAW EVENTS ON THE VIABILITY OF CRYPTOSPORIDIUM PARVUM OOCYSTS IN SOIL. J. Parasitol. 88, 718–722. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0718:EOFTEO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0718:EOFTEO]2.0.CO;2)
- Kaushal, D.C., Shukla, O.P., 1977. Excystment of axenically prepared cysts of Hartmanella culbertsoni. J. Gen. Microbiol. 98, 117–123. <https://doi.org/10.1099/00221287-98-1-117>
- Keusch, G.T., Hamer, D., Joe, A., Kelley, M., Griffiths, J., Ward, H., 1995. Cryptosporidia--who is at risk? Schweiz. Med. Wochenschr. 125, 899–908.
- Khalidi, S., Gargala, G., Le Goff, L., Parey, S., Francois, A., Fioramonti, J., Ballet, J.-J., Dupont, J.-P., Ducrotté, P., Favennec, L., 2009. Cryptosporidium parvum isolate-dependent postinfectious jejunal hypersensitivity and mast cell accumulation in an immunocompetent rat model. Infect. Immun. 77, 5163–5169. <https://doi.org/10.1128/IAI.00220-09>
- Khalil, I.A., Troeger, C., Rao, P.C., Blacker, B.F., Brown, A., Brewer, T.G., Colombara, D.V., De Hostos, E.L., Engmann, C., Guerrant, R.L., Haque, R., Hout, E.R., Kang, G., Korpe, P.S., Kotloff, K.L., Lima, A.A.M., Petri, W.A., Platts-Mills, J.A., Shultz, D.A., Forouzanfar, M.H., Hay, S.I., Reiner, R.C., Mokdad, A.H., 2018. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from Cryptosporidium infection in children younger than 5 years: a meta-analysis study. Lancet Glob. Health 6, e758–e768. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30283-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30283-3)
- Khan, A., Shaik, J.S., Grigg, M.E., 2018. Genomics and molecular epidemiology of Cryptosporidium species. Acta Trop. 184, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>
- Khan, N.A., 2006. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol. Rev. 30, 564–595. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>
- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Paget, T.A., 2002. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic Acanthamoeba. Curr. Microbiol. 45, 197–202. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0108-3>
- Khan, N.A., Siddiqui, R., 2015. Is there evidence of sexual reproduction (meiosis) in Acanthamoeba? Pathog. Glob. Health 109, 193–195. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000009>

- Khan, N.A., Siddiqui, R., 2014. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. *Parasitology* 141, 869–874. <https://doi.org/10.1017/S003118201300231X>
- Khan, N.A., Tareen, N.K., 2003. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol. (Praha)* 50, 97–104. <https://doi.org/10.14411/fp.2003.017>
- Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J.R., Frazer, D.G., Matheson, M., 2004. *Acanthamoeba* Keratitis: The Role of Domestic Tap Water Contamination in the United Kingdom. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 165–169. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0559>
- Kilvington, S., Price, J., 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 519–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02904.x>
- King, B.J., Hoefel, D., Daminato, D.P., Fanok, S., Monis, P.T., 2008. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1311–1323. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03658.x>
- King, B.J., Keegan, A.R., Monis, P.T., Saint, C.P., 2005. Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3848–3857. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3848-3857.2005>
- King, B.J., Monis, P.T., 2007. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology* 134, 309. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001491>
- King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E., Porter, K.G., 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3023–3033. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3023-3033.1988>
- King, J.S., Kay, R.R., 2019. The origins and evolution of macropinocytosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 374, 20180158. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0158>
- Koh, W., Clode, P.L., Monis, P., Thompson, R.C.A., 2013. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasit. Vectors* 6, 270. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-270>
- Köhler, M., Leitsch, D., Fürnkranz, U., Duchêne, M., Aspöck, H., Walochnik, J., 2008. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol. Res.* 102, 1069–1072. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0885-8>
- Kopacz, Ž., Kváč, M., Karpíński, P., Hendrich, A.B., Sasiadek, M.M., Leszczyński, P., Sak, B., McEvoy, J., Kicia, M., 2019. The First Evidence of *Cryptosporidium meleagridis* Infection in a Colon Adenocarcinoma From an Immunocompetent Patient. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9.
- Korich, D.G., Marshall, M.M., Smith, H.V., O'Grady, J., Bukhari, Z., Fricker, C.R., Rosen, J.P., Clancy, J.L., 2000. Inter-laboratory comparison of the CD-1 neonatal mouse logistic dose-response model for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 294–298. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00050.x>

- Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R., 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1423–1428. <https://doi.org/10.1128/aem.56.5.1423-1428.1990>
- Kot, K., Łanocha-Arendarczyk, N.A., Kosik-Bogacka, D.I., 2018. Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. *Ann. Parasitol.* 64, 299–308.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S., Zaidi, A.K., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omore, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., Levine, M.M., 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet* 382, 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)
- Król-Turmińska, K., Olender, A., 2017. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24, 254–260. <https://doi.org/10.5604/12321966.1233568>
- Kubina, S., 2017. Etude de la survie et de l'adhérence des oocystes de *Cryptosporidium parvum* sur une matrice alimentaire végétale : la mâche (These en préparation). Normandie.
- Kubina, S., Costa, D., Favennec, L., Gargala, G., Rousseau, A., Villena, I., La Carbona, S., Razakandrainibe, R., 2021. Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Lamb's Lettuce: CC-qPCR's Intake. *Microorganisms* 9, 215. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020215>
- Kuchta, J.M., Navratil, J.S., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J., Yee, R.B., 1993. Impact of Chlorine and Heat on the Survival of *Hartmannella vermiformis* and Subsequent Growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4096–4100. <https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4096-4100.1993>
- Kváč, M., Kouba, M., Vítovec, J., 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 137, 202–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.027>
- Kyle, D.E., Noblet, G.P., 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* 33, 422–434. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1986.tb05634.x>
- La Scola, B., Barrassi, L., Raoult, D., 2004. A novel alpha-Proteobacterium, *Nordella oligomobilis* gen. nov., sp. nov., isolated by using amoebal co-cultures. *Res. Microbiol.* 155, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.012>
- Lal, A., Hales, S., French, N., Baker, M.G., 2012. Seasonality in Human Zoonotic Enteric Diseases: A Systematic Review. *PLoS ONE* 7, e31883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031883>
- Lalitha, P., Lin, C.C., Srinivasan, M., Mascarenhas, J., Prajna, N.V., Keenan, J.D., McLeod, S.D., Acharya, N.R., Lietman, T.M., Porco, T.C., 2012. *Acanthamoeba* keratitis in South India: a longitudinal analysis of epidemics. *Ophthalmic Epidemiol.* 19, 111–115. <https://doi.org/10.3109/09286586.2011.645990>

- Lamb, N., 2018. *Cryptosporidium* spp. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.33>
- Lambrecht, E., Baré, J., Sabbe, K., Houf, K., 2017. Impact of *Acanthamoeba* Cysts on Stress Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* 4/O:3, *Listeria monocytogenes* 1/2a, and *Escherichia coli* O:26. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00754-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00754-17>
- Lamoth, F., Greub, G., 2010. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 260–280. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00207.x>
- Langlais, B., Perrine, D., 1986. Action of Ozone on Trophozoites and Free *Amoeba* cysts, Whether Pathogenic or Not. *Ozone Sci. Eng.* 8, 187–198. <https://doi.org/10.1080/01919518608552402>
- Lasheras, A., Boulestreau, H., Rogues, A.-M., Ohayon-Courtes, C., Labadie, J.-C., Gachie, J.-P., 2006. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am. J. Infect. Control* 34, 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.03.007>
- Le Magrex-Debar, E., Lemoine, J., Gellé, M.-P., Jacquelin, L.-F., Choisy, C., 2000. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 239–243. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00177-X)
- Lee, X., Reimann, C., Greub, G., Sufrin, J., Croxatto, A., 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbes Infect.* 14, 268–272. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.004>
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet. Parasitol.* 89, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00230-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00230-7)
- Lefebvre, M., Razakandrainibe, R., Villena, I., Favennec, L., Costa, D., 2020. A review on *Cryptosporidium* and biofilm interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.02483-20>
- Leitch, G.J., He, Q., 2012. Cryptosporidiosis-an overview. *J. Biomed. Res.* 25, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60001-8](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60001-8)
- Leitch, G.J., He, Q., 2011. Cryptosporidiosis-an overview. *J. Biomed. Res.* 25, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60001-8](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60001-8)
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N.A., Walochnik, J., 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22, 10. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015010>
- Loret, J.-F., Greub, G., 2010. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.03.004>
- Loret, J.-F., Jousset, M., Robert, S., Anselme, C., Saucedo, G., Ribas, F., Martinez, L., Catalan, V., 2008. Élimination des amibes libres par les procédés de traitement de l'eau potable. *Eur. J. Water Qual.* 39, 37–50. <https://doi.org/10.1051/wqual/2008011>

- Loret, J.F., Jousset, M., Robert, S., Saucedo, G., Ribas, F., Thomas, V., Greub, G., 2008. Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 58, 571–577. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.423>
- Ludwig, I.H., Meisler, D.M., Rutherford, I., Bican, F.E., Langston, R.H., Visvesvara, G.S., 1986. Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27, 626–628.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist*Address for correspondence: Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA. *Microbes Infect.* 2, 1051–1060. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01259-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01259-4)
- Ma, P., 1984. Cryptosporidium and the enteropathy of immune deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3, 488–490.
- 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. <https://doi.org/10.1093/infdis/147.5.824>
- Ma, P., Visvesvara, G.S., Martinez, A.J., Theodore, F.H., Daggett, P.M., Sawyer, T.K., 1990. Naegleria and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev. Infect. Dis.* 12, 490–513. <https://doi.org/10.1093/clinids/12.3.490>
- 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., Davis, J.P., 1994. A Massive Outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium Infection Transmitted through the Public Water Supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167. <https://doi.org/10.1056/NEJM199407213310304>
- Mah, T.F., O’Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34–39. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2)
- Mahgoub, A., n.d. *Acanthamoeba Keratitis*. puj.eg.net.
- Majewska, A.C., Werner, A., Sulima, P., Luty, T., 2000. Prevalence of Cryptosporidium in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. *Vet. Parasitol.* 89, 269–275. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00212-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00212-0)
- Majowicz, S.E., Michel, P., Aramini, J.J., McEwen, S.A., Wilson, J.B., 2001. Descriptive Analysis of Endemic Cryptosporidiosis Cases Reported in Ontario, 1996–1997. *Can. J. Public Health Rev. Can. Santé Publique* 92, 62–66. <https://doi.org/10.1007/BF03404847>
- Manthey, M.W., Ross, A.B., Soergel, K.H., 1997. Cryptosporidiosis and inflammatory bowel disease. Experience from the Milwaukee outbreak. *Dig. Dis. Sci.* 42, 1580–1586. <https://doi.org/10.1023/a:1018828507990>
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 273–307. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>
- Marion, R., Baishanbo, A., Gargala, G., François, A., Ducrotté, P., Duclos, C., Fioramonti, J., Ballet, J.J., Favennec, L., 2006. Transient neonatal *Cryptosporidium parvum* infection triggers long-term jejunal hypersensitivity to distension in immunocompetent rats. *Infect. Immun.* 74, 4387–4389. <https://doi.org/10.1128/IAI.02055-05>

Maschio, V.J., Corção, G., Rott, M.B., 2015. IDENTIFICATION OF *Pseudomonas* spp. AS AMOEBIA-RESISTANT MICROORGANISMS IN ISOLATES OF *Acanthamoeba*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 57, 81–83. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100012>

Matoba, A.Y., Pare, P.D., Le, T.D., Osato, M.S., 1989. The effects of freezing and antibiotics on the viability of *Acanthamoeba* cysts. Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960 107, 439–440. <https://doi.org/10.1001/archophth.1989.01070010449043>

Mattar, F., Byers, T.J., 1971. MORPHOLOGICAL CHANGES AND THE REQUIREMENTS FOR MACROMOLECULE SYNTHESIS DURING EXCYSTMENT OF *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*. J. Cell Biol. <https://doi.org/10.1083/JCB.49.2.507>

Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2004. Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. Environ. Microbiol. 6, 218–226. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00556.x>

Mawdsley, J.L., Brooks, A.E., Merry, R.J., 1996. Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. Biol. Fertil. Soils 21, 30–36. <https://doi.org/10.1007/BF00335990>

Maya, C., Beltrán, N., Jiménez, B., Bonilla, P., 2003. Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoebae inactivation. Water Supply 3, 285–291. <https://doi.org/10.2166/ws.2003.0074>

Mazur, T., Hadaś, E., 1994. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. Parasitol. Res. 80, 431–434. <https://doi.org/10.1007/BF00932382>

Mazur, T., Hadaś, E., Iwanicka, I., 1995. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. Trop. Med. Parasitol. Off. Organ Dtsch. Tropenmedizinische Ges. Dtsch. Ges. Tech. Zusammenarbeit GTZ 46, 106–108.

McCole, D.F., Eckmann, L., Laurent, F., Kagnoff, M.F., 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. Infect. Immun. 68, 1710–1713. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1710-1713.2000>

McKerr, C., Adak, G.K., Nichols, G., Gorton, R., Chalmers, R.M., Kafatos, G., Cosford, P., Charlett, A., Reacher, M., Pollock, K.G., Alexander, C.L., Morton, S., 2015. An Outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland Associated with Consumption of Fresh Pre-Cut Salad Leaves, May 2012. PLoS ONE 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125955>

McLauchlin, J., Amar, C., Pedraza-Díaz, S., Nichols, G.L., 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.3984-3990.2000>

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.

Meisler, D.M., Ludwig, I.H., Rutherford, I., Bican, F.E., Langston, R.H., Visvesvara, G.S., 1986. Susceptibility of *Acanthamoeba* to cryotherapeutic method. Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960 104, 130–131. <https://doi.org/10.1001/archophth.1986.01050130144040>

Meisler, D.M., Rutherford, I., Bican, F.E., Ludwig, I.H., Langston, R.H., Hall, G.S., Rhinehart, E., Visvesvara, G.S., 1985. Susceptibility of *Acanthamoeba* to surgical instrument sterilization techniques. *Am. J. Ophthalmol.* 99, 724–725. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(14\)76048-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(14)76048-9)

MEMARI, F., NIYYATI, M., JONEIDI, Z., 2017. Pathogenic *Acanthamoeba* T4 Genotype Isolated from Mucosal Tissue of a Patient with HIV Infection: A Case Report. *Iran. J. Parasitol.* 12, 143–147.

Ménard-Szczebara, F., Berthelot, N., Cavereau, D., Sandrine, O., Hechard, Y., Sarroca, V., Riviere, D., Mazoua, S., 2008. Ecology of free-amoebae in real in-house water networks. <http://dx.doi.org/10.1051/wqual/2008013> 39.

Michel, R., Burghardt, H., Bergmann, H., 1995. [*Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital]. *Zentralblatt Hyg. Umweltmed. Int. J. Hyg. Environ. Med.* 196, 532–544.

Miklos, 2015. English: The stages of *Amoeba* phagocytosis.

Miltner, E.C., Bermudez, L.E., 2000. *Mycobacterium avium* Grown in *Acanthamoeba castellanii* Is Protected from the Effects of Antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1990–1994.

Mmbaga, B.T., Houpt, E.R., 2017. *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Children. *Pediatr. Clin. North Am.* 64, 837–850. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.014>

Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., Kwaik, Y.A., 2005. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 20–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>

Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Lal, A., Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 433–440. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00224.x>

Moriarty, E.M., Duffy, G., McEvoy, J.M., Caccio, S., Sheridan, J.J., McDowell, D., Blair, I.S., 2005. The effect of thermal treatments on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* on beef surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 98, 618–623. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02498.x>

Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N., Fujiwara, M., 2002. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5387–5393. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5387-5393.2002>

Mukherjee, S., Stamatis, D., Bertsch, J., Ovchinnikova, G., Katta, H.Y., Mojica, A., Chen, I.-M.A., Kyrpides, N.C., Reddy, T., 2019. Genomes OnLine database (GOLD) v.7: updates and new features. *Nucleic Acids Res.* 47, D649–D659. <https://doi.org/10.1093/nar/gky977>

Mungroo, M.R., Siddiqui, R., Khan, N.A., 2021. War of the microbial world: *Acanthamoeba* spp. interactions with microorganisms. *Folia Microbiol. (Praha)* 66, 689–699. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00889-7>

Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., Donlan, R.M., 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 3121–3126. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-11-3121>

- Naginton, J., Watson, P.G., Playfair, T.J., McGill, J., Jones, B.R., Steele, A.D., 1974. Amoebic infection of the eye. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1537–1540. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)90285-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)90285-2)
- Nakibirango, J., Mugenyi, V., Nsaba, D., Nsimemukama, A., Rugera, S.P., Okongo, B., 2019. Prevalence of cryptosporidiosis and hygiene practices among HIV/AIDS patients in southwest Uganda. *HIV/AIDS Auckl. NZ* 11, 141–145. <https://doi.org/10.2147/HIV.S206195>
- Napolitano, J.J., 1982. Isolation of amoebae from edible mushrooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 255–257. <https://doi.org/10.1128/aem.44.1.255-257.1982>
- Naumova, E.N., Christodouleas, J., Hunter, P.R., Syed, Q., 2005. Effect of precipitation on seasonal variability in cryptosporidiosis recorded by the North West England surveillance system in 1990–1999. *J. Water Health* 3, 185–196.
- 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., Juraneck, D.D., Schwartz, D.A., Wilcox, C.M., Stewart, J.M., Thompson, S.E., 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. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 20, 154–159. <https://doi.org/10.1097/00042560-199902010-00007>
- Neff, R.J., Ray, S.A., Benton, W.F., Wilborn, M., 1964. Chapter 4 Induction of Synchronous Encystment (Differentiation) in *Acanthamoeba* sp., in: Prescott, D.M. (Ed.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 55–83. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62086-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62086-5)
- Neumann, N.F., Gyürék, L.L., Finch, G.R., Belosevic, M., 2000. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 331–336. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08980.x>
- Niederhorn, J.Y., Alizadeh, H., Leher, H., McCulley, J.P., 1999. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes Infect.* 1, 437–443. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80047-1](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80047-1)
- Nieminski, E.C., Bellamy, W.D., Moss, L.R., 2000. Using surrogates to improve plant performance. *J. AWWA* 92, 67–78. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2000.tb08910.x>
- Nikolaev, I.A., Plakunov, V.K., 2007. [Biofilm--"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms?]. *Mikrobiologiya* 76, 149–163.
- 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.
- Noordeen, F., Rajapakse, R.P., Faizal, A.C., Horadagoda, N.U., Arulkanthan, A., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats in selected locations in three agroclimatic zones of Sri Lanka. *Vet. Parasitol.* 93, 95–101. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00361-7)
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T., Ohgaki, S., 2001. Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4630–4637. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4630-4637.2001>

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. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.441-443.1998>

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-gamma knockout mice. *J. Infect. Dis.* 185, 1320–1325. <https://doi.org/10.1086/340132>

Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet. Parasitol.* 68, 375–381. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01072-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01072-2)

Opoku, Y.K., Boampong, J.N., Ayi, I., Kwakye-Nuako, G., Obiri-Yeboah, D., Koranteng, H., Ghartey-Kwansah, G., Asare, K.K., 2018. Socio-Behavioral Risk Factors Associated with Cryptosporidiosis in HIV/AIDS Patients Visiting the HIV Referral Clinic at Cape Coast Teaching Hospital, Ghana. *Open AIDS J.* 12, 106–116. <https://doi.org/10.2174/1874613601812010106>

Osman, M., Benamrouz, S., Guyot, K., Baydoun, M., Fréalle, E., Chabe, M., Gantois, N., Delaire, B., Goffard, A., Aoun, A., Jurdi, N., Dabboussi, F., Even, G., Slomianny, C., Gosset, P., Hamze, M., Creusy, C., Viscogliosi, E., Certad, G., 2017. High association of *Cryptosporidium* spp. infection with colon adenocarcinoma in Lebanese patients. *PLoS ONE* 12, e0189422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189422>

Ovrutsky, A.R., Chan, E.D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J.O., Iseman, M.D., Reynolds, P.R., McDonnell, G., Thomas, V., 2013. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous *Mycobacteria* in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3185–3192. <https://doi.org/10.1128/AEM.03823-12>

Page, F.C., 1987. The Classification of ‘Naked’ Amoebae (Phylum Rhizopoda). *Arch. Für Protistenkd.* 133, 199–217. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(87\)80053-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(87)80053-2)

Pagnier, I., Valles, C., Raoult, D., La Scola, B., 2015. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microb. Pathog.* 80, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.02.006>

Paoletti, A., 2002. Données récentes sur la transmission des cryptosporidioses animales à l’homme (other).

Parker, J.F.W., Greaves, G.F., Smith, H.V., 1993. The Effect of Ozone on the Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts and a Comparison of Experimental Methods. *Water Sci. Technol.* 27, 93–96. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0328>

Pecková, R., Stuart, P.D., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., Foitová, I., 2016. Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 230, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.007>

Peeters, J.E., Mazás, E.A., Masschelein, W.J., Villacorta Martiez de Maturana, I., Debacker, E., 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1519–1522.

- Petry, F., 2004. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microsc. Microanal.* 10, 586–601. <https://doi.org/10.1017/S1431927604040929>
- Pickup, Z.L., Pickup, R., Parry, J.D., 2007. Growth of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 264–272. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00346.x>
- Platts-Mills, J.A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B.J., McGrath, M., Olortegui, M.P., Samie, A., Shakoor, S., Mondal, D., Lima, I.F., Hariraju, D., Rayamajhi, B.B., Qureshi, S., Kabir, F., Yori, P.P., Mufamadi, B., Amour, C., Carreon, J.D., Richard, S.A., Lang, D., Bessong, P., Mduma, E., Ahmed, T., Lima, A.A., Mason, C.J., Zaidi, A.K., Bhutta, Z.A., Kosek, M., Guerrant, R.L., Gottlieb, M., Miller, M., Kang, G., Houghton, E.R., 2015. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob. Health* 3, e564–e575. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(15\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(15)00151-5)
- Pozio, E., Morales, M.A.G., 2005. The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol.* 21, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.11.003>
- Preiser, G., Preiser, L., Madeo, L., 2003. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *J. Am. Coll. Health J ACH* 51, 213–215. <https://doi.org/10.1080/07448480309596353>
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., Mekalanos, J.J., 2002. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3159–3164. <https://doi.org/10.1073/pnas.052704399>
- Pumidonming, W., Koehsler, M., Walochnik, J., 2010. *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitol. Res.* 106, 553–559. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1694-4>
- Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R., da Silva, A.J., 2006. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3589–3595. <https://doi.org/10.1128/JCM.00875-06>
- Raizada, M.K., Murti, C.R., 1971. Changes in the activity of certain enzymes of *Hartmannella* (Culbertson strain A-1) during encystment. *J. Protozool.* 18, 115–119. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03291.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.02.021>
- Ransome M.E., T.N. Whitmore, E.G. Carrington, 1993. Effect of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Wat Suppl.*
- Rayamajhee, B., Subedi, D., Peguda, H.K., Willcox, M.D., Henriquez, F.L., Carnt, N., 2021. A Systematic Review of Intracellular Microorganisms within *Acanthamoeba* to Understand Potential Impact for Infection. *Pathogens* 10, 225. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020225>

- Razakandrainibe, R., Diawara, E.H.I., Costa, D., Le Goff, L., Lemeteil, D., Ballet, J.J., Gargala, G., Favennec, L., 2018. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006355. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006355>
- Razakandrainibe, R., Kubina, S., Costa, D., Robinson, G., La Carbona, S., Aubert, D., David, A., Gargala, G., Villena, I., Favennec, L., Chalmers, R.M., 2020. Evaluation of a modified method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts on spinach leaves. *Food Waterborne Parasitol.* 21, e00097. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00097>
- Reeder, W.H.H., Sanck, J., Hirst, M., Dawson, S.C., Wolfe, G.V., 2015. Food Web of Boiling Springs Lake Appears Dominated by the Heterolobosean *Tetramitus thermacidophilus* Strain BSL. *J. Eukaryot. Microbiol.*
- Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., Daudé, D., 2018. Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Front. Pharmacol.* 9, 203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00203>
- Ren, M., Wu, X., 2010. Evaluation of Three Different Methods to Establish Animal Models of *Acanthamoeba Keratitis*. *Yonsei Med. J.* 51, 121–7. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.1.121>
- Rice, E.W., Fox, K.R., Miltner, R.J., Lytle, D.A., Johnson, C.H., 1996. Evaluating plant performance with endospores. *J. AWWA* 88, 122–130. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1996.tb06618.x>
- Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling bacterial biofilms. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* 10, 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900317>
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1998. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: assessment by the dye permeability assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3544–3545. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3544-3545.1998>
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1993. In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 106 (Pt 1), 13–19. <https://doi.org/10.1017/s003118200007476x>
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3494–3500. <https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3494-3500.1992>
- Robinson, G., Chalmers, R.M., 2020. *Cryptosporidium* Diagnostic Assays: Microscopy, in: Mead, J.R., Arrowood, M.J. (Eds.), *Cryptosporidium, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9748-0_1
- Rocha, C.L., Coburn, J., Rucks, E.A., Olson, J.C., 2003. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S as a Bifunctional Enzyme in J774A.1 Macrophages. *Infect. Immun.* 71, 5296–5305. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5296-5305.2003>
- Rochelle, P.A., Ferguson, D.M., Handojo, T.J., De Leon, R., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., 1997. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2029–2037. <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.2029-2037.1997>

- Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korich, D.G., Rosen, J.S., De Leon, R., 2002. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3809–3817. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3809-3817.2002>
- Rodríguez-Pérez, E.G., Arce-Mendoza, A.Y., Montes-Zapata, É.I., Limón, A., Rodríguez, L.É., Escandón-Vargas, K., 2019. Opportunistic intestinal parasites in immunocompromised patients from a tertiary hospital in Monterrey, Mexico. *Infez. Med.* 27, 168–174.
- Rodríguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 225–241. <https://doi.org/10.3109/10408419409114556>
- Rogerson, A., Anderson, O.R., Vogel, C., 2003. Are planktonic naked amoebae predominately floc associated or free in the water column? *J. Plankton Res.* 25, 1359–1365. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg102>
- Rogerson, A., Laybourn-Parry, J., 1992. Aggregate dwelling protozooplankton communities in estuaries. *Arch. Für Hydrobiol.* 125, 411–422. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/125/1992/411>
- Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F., Wilhelm, M., 1998. Comparison of Free-Living Amoebae in Hot Water Systems of Hospitals with Isolates from Moist Sanitary Areas by Identifying Genera and Determining Temperature Tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1822–1824.
- Rønn, R., McCaig, A.E., Griffiths, B.S., Prosser, J.I., 2002. Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6094–6105. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6094-6105.2002>
- Rose, J.B., Landeen, L.K., Riley, K.R., Gerba, C.P., 1989. Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3189–3196.
- Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *ISME J.* 3, 675–684. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.11>
- Rossignol, J., Kabil, S.M., El-Gohary, Y., Younis, A.M., 2006. Effect of Nitazoxanide in Diarrhea and Enteritis Caused by *Cryptosporidium* Species. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 320–324. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.12.020>
- Rossignol, J.F., Ayoub, A., Ayers, M.S., 2001. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* 184, 103–106. <https://doi.org/10.1086/321008>
- Rossle, N.F., Latif, B., 2013. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 916–924. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60179-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60179-3)
- Rousseau, A., La Carbona, S., Dumètre, A., Robertson, L.J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., Favennec, L., Villena, I., Gérard, C., Aubert, D., 2018. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite Paris Fr.* 25, 14. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018009>
- Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141, 1667–1685. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001085>

- Ryan, U., Hijjawi, N., Xiao, L., 2018. Foodborne cryptosporidiosis. *Int. J. Parasitol.* 48, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.09.004>
- Ryan, Una, Paparini, A., Monis, P., Hijjawi, N., 2016. It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Res.* 105, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>
- Ryan, U., Zahedi, A., Paparini, A., 2016. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunol.* 38, 535–547. <https://doi.org/10.1111/pim.12350>
- Saeed, A., Abd, H., Edvinsson, B., Sandstrom, G., 2007. *Vibrio cholerae*-*Acanthamoeba castellanii* interaction showing endosymbiont-host relation 6.
- Saini, P.K., Ransom, G., McNamara, A.M., 2000. Emerging public health concerns regarding cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 658–663. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.658>
- Salameh, A., Bello, N., Becker, J., Zangeneh, T., 2015. Fatal Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba* in a Patient With Kidney Transplant: A Case Report. *Open Forum Infect. Dis.* 2, ofv104. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv104>
- Samal, S., Das, P., 2018. Microbial Biofilms: Pathogenicity and Treatment Strategies. *Pharmatutor* 6, 16. <https://doi.org/10.29161/PT.v6.i1.2018.16>
- Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M.-H., Cateau, E., Héchard, Y., 2019. Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 415–434. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz011>
- Sandstrom, G., Saeed, A., Abd, H., 2011. *Acanthamoeba*-Bacteria: A Model to Study Host Interaction with Human Pathogens. *Curr. Drug Targets* 12, 936–941. <https://doi.org/10.2174/138945011795677845>
- Sannella, A.R., Suputtamongkol, Y., Wongsawat, E., Cacciò, S.M., 2019. A retrospective molecular study of *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-infected patients from Thailand. *Parasit. Vectors* 12, 91. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3348-4>
- Santín, 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.018>
- Santín, 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.020>
- Sawant, M., Baydoun, M., Creusy, C., Chabé, M., Viscogliosi, E., Certad, G., Benamrouz-Vanneste, S., 2020. *Cryptosporidium* and Colon Cancer: Cause or Consequence? *Microorganisms* 8, 1665. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111665>
- schaeffer, 1926. Classification of *Amoebæ* 1. *Nature* 118, 536–536. <https://doi.org/10.1038/118536a0>
- Scheid, P., 2014. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol. Res.* 113, 2407–2414. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3932-7>
- Scheid, P.L., 2018. New Insights into the Interaction of Free-Living Amoebae and : Investigations of the Host Range and the Role of Multilamellar Bodies. *Open Parasitol. J.* 6. <https://doi.org/10.2174/1874421401806010063>

- Scheid, P.L., Lâm, T.-T., Sinsch, U., Balczun, C., 2019. *Vermamoeba vermiformis* as etiological agent of a painful ulcer close to the eye. *Parasitol. Res.* 118, 1999–2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06312-y>
- Scheid, P.L., Schwarzenberger, R., 2011. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. *Parasitol. Res.* 109, 499–504. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2287-6>
- Schuster, F.L., Levandowsky, M., 1996. Chemosensory Responses of *Acanthamoeba castellanii*: Visual Analysis of Random Movement and Responses to Chemical Signals. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 150–158. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb04496.x>
- Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* 34, 1001–1027. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.004>
- Seal, D.V., 2003. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye Lond. Engl.* 17, 893–905. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700563>
- Semaha, S., 2020. Les kératites infectieuses : manifestations cliniques et prise en charge 137.
- Sengor, T., Kurna, S.A., Altun, A., Irkec, M., Aki, S.F., Aksoy, S., 2015. Contact Lens-Related *Acanthamoeba* Keratitis and Accompanying Dacryoadenitis. *Eye Contact Lens* 41, 204–209. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000114>
- Sharma, S., Garg, P., Rao, G.N., 2000. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 1103–1108. <https://doi.org/10.1136/bjo.84.10.1103>
- Sharma, S., Pasricha, G., Das, D., Aggarwal, R.K., 2004. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India: DNA typing-based validation and a simple detection assay. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 122, 1430–1434. <https://doi.org/10.1001/archoph.122.10.1430>
- Sharma, S., Srinivasan, M., George, C., 1990. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 108, 676–678. <https://doi.org/10.1001/archoph.1990.01070070062035>
- Shi, Y., Queller, D.C., Tian, Y., Zhang, S., Yan, Q., He, Zhili, He, Zhenzhen, Wu, C., Wang, C., Shu, L., 2021. The Ecology and Evolution of Amoeba-Bacterium Interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e01866-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01866-20>
- Shin, G.A., Linden, K.G., Arrowood, M.J., Sobsey, M.D., 2001. Low-pressure UV inactivation and DNA repair potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3029–3032. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3029-3032.2001>
- Shoff, M.E., Rogerson, A., Kessler, K., Schatz, S., Seal, D.V., 2008. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *J. Water Health* 6, 99–104. <https://doi.org/10.2166/wh.2007.014>
- Siddiqui, R., Khan, N.A., 2012. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Exp. Parasitol.* 130, 95–97. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.005>

Slifko, T.R., Friedman, D., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1997. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3669–3675. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3669-3675.1997>

Slifko, T.R., Huffman, D.E., Dussert, B., Owens, J.H., Jakubowski, W., Haas, C.N., Rose, J.B., 2002. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp. Parasitol.* 101, 97–106. [https://doi.org/10.1016/s0014-4894\(02\)00100-5](https://doi.org/10.1016/s0014-4894(02)00100-5)

Smirnov, A., Nassonova, E., Berney, C., Fahrni, J., Bolivar, I., Pawlowski, J., 2005. Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist* 156, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.06.002>

Smirnov, A.V., Chao, E., Nassonova, E.S., Cavalier-Smith, T., 2011. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist* 162, 545–570. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.04.004>

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. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006406>

Smith, H.V., McDiarmid, A., Smith, A.L., Hinson, A.R., Gilmour, R.A., 1989. An analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water-related samples. *Parasitology* 99 Pt 3, 323–327. <https://doi.org/10.1017/s0031182000059023>

Sopwith, W., Osborn, K., Chalmers, R., Regan, M., 2005. The changing epidemiology of cryptosporidiosis in North West England. *Epidemiol. Infect.* 133, 785–793. <https://doi.org/10.1017/S0950268805004772>

Sousa-Ramos, D., Reyes-Battle, M., Bellini, N.K., Rodríguez-Expósito, R.L., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., 2021. Free-Living Amoebae in Soil Samples from Santiago Island, Cape Verde. *Microorganisms* 9, 1460. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071460>

Sow, S.O., Muhsen, K., Nasrin, D., Blackwelder, W.C., Wu, Y., Farag, T.H., Panchalingam, S., Sur, D., Zaidi, A.K.M., Faruque, A.S.G., Saha, D., Adegbola, R., Alonso, P.L., Breiman, R.F., Bassat, Q., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Hossain, A., Das, S.K., Antonio, M., Hossain, M.J., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Omore, R., Oundo, J.O., Ochieng, J.B., Mintz, E.D., O'Reilly, C.E., Berkeley, L.Y., Livio, S., Tennant, S.M., Sommerfelt, H., Nataro, J.P., Ziv-Baran, T., Robins-Browne, R.M., Mishcherkin, V., Zhang, J., Liu, J., Houpt, E.R., Kotloff, K.L., Levine, M.M., 2016. The Burden of *Cryptosporidium* Diarrheal Disease among Children < 24 Months of Age in Moderate/High Mortality Regions of Sub-Saharan Africa and South Asia, Utilizing Data from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004729. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004729>

Sponseller, J.K., Griffiths, J.K., Tzipori, S., 2014. The Evolution of Respiratory Cryptosporidiosis: Evidence for Transmission by Inhalation. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 575–586. <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-13>

Srikanth, S., Berk, S.G., 1994. Adaptation of amoebae to cooling tower biocides. *Microb. Ecol.* 27, 293–301. <https://doi.org/10.1007/BF00182412>

Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., Visvesvara, G.S., 2008. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4045–4048. <https://doi.org/10.1128/JCM.01903-08>

Stamm, L.M., Morisaki, J.H., Gao, L.-Y., Jeng, R.L., McDonald, K.L., Roth, R., Takeshita, S., Heuser, J., Welch, M.D., Brown, E.J., 2003. *Mycobacterium marinum* Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility. *J. Exp. Med.* 198, 1361–1368. <https://doi.org/10.1084/jem.20031072>

Stanley, S.M., 1973. An ecological theory for the sudden origin of multicellular life in the late precambrian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1486–1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.5.1486>

Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D., Malliaris, S.D., Casadevall, A., 2003. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect. Immun.* 71, 4862–4872. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4862-4872.2003>

Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F., 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2256–2261. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2256-2261.1998>

Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J., Stenström, T.-A., 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand. J. Infect. Dis.* 36, 656–662. <https://doi.org/10.1080/00365540410020785>

Stott, R., May, E., Matsushita, E., Warren, A., 2001. Protozoan predation as a mechanism for the removal of cryptosporidium oocysts from wastewaters in constructed wetlands. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 44, 191–198.

Stott, R., May, E., Ramirez, E., Warren, A., 2003. Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: Implications for water quality and public health. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 47, 77–83. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0166>

Swathirajan, C.R., Vignesh, R., Pradeep, A., Solomon, S.S., Solomon, S., Balakrishnan, P., 2017. Occurrence of enteric parasitic infections among HIV-infected individuals and its relation to CD4 T-cell counts with a special emphasis on coccidian parasites at a tertiary care centre in South India. *Indian J. Med. Microbiol.* 35, 37–40. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_164

Taher, E.E., Méabed, E.M.H., Abdallah, I., Abdel Wahed, W.Y., 2018. *Acanthamoeba* keratitis in noncompliant soft contact lenses users: Genotyping and risk factors, a study from Cairo, Egypt. *J. Infect. Public Health* 11, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.013>

Tam, C.C., Rodrigues, L.C., Viviani, L., Dodds, J.P., Evans, M.R., Hunter, P.R., Gray, J.J., Letley, L.H., Rait, G., Tompkins, D.S., O'Brien, S.J., 2012. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut* 61, 69–77. <https://doi.org/10.1136/gut.2011.238386>

Tamburrini, A., Pozio, E., 1999. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 29, 711–715. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00033-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00033-8)

Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G., 2006. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2428–2438. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006>

- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.-Y., 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 231–259. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x>
- Tosetti, N., Croxatto, A., Greub, G., 2014. Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host–pathogen interactions. *Microb. Pathog.* 77, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.07.009>
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A., 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol.* 60, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>
- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, M., 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Vet. Res.* 78, 110–116.
- Turner, N.A., Russell, A.D., Furr, J.R., Lloyd, D., 2000. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 27–34. <https://doi.org/10.1093/jac/46.1.27>
- Tyndall, R.L., Ironside, K.S., Metler, P.L., Tan, E.L., Hazen, T.C., Fliermans, C.B., 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 722–732. <https://doi.org/10.1128/aem.55.3.722-732.1989>
- Tzipori, S., Widmer, G., 2008. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 24, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.01.002>
- Ubelaker, J.E., 1991. *Acanthamoeba* spp.: “Opportunistic Pathogens.” *Trans. Am. Microsc. Soc.* 110, 289. <https://doi.org/10.2307/3226764>
- Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1994. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 233–236. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06833.x>
- US EPA, 2006. Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule. United States environmental protection agency, Washington DC.
- US EPA, O., 2015. Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule Documents [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/dwreginfo/long-term-2-enhanced-surface-water-treatment-rule-documents> (accessed 10.5.22).
- Utaaker, K.S., Skjerve, E., Robertson, L.J., 2017. Keeping it cool: Survival of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts on lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* 255, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.009>
- Valster, R.M., Wullings, B.A., Bakker, G., Smidt, H., van der Kooij, D., 2009. Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies, identified by phylogenetic analysis of 18S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4736–4746. <https://doi.org/10.1128/AEM.02629-08>
- Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>

- Vanathy, K., Parija, S.C., Mandal, J., Hamide, A., Krishnamurthy, S., 2017. Cryptosporidiosis: A mini review. *Trop. Parasitol.* 7, 72–80. https://doi.org/10.4103/tp.TP_25_17
- Vemuganti, G.K., Reddy, K., Iftekhar, G., Garg, P., Sharma, S., 2004. Keratocyte loss in corneal infection through apoptosis: a histologic study of 59 cases. *BMC Ophthalmol.* 4, 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-4-16>
- Vermeulen, L.C., Benders, J., Medema, G., Hofstra, N., 2017. Global Cryptosporidium Loads from Livestock Manure. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8663–8671. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00452>
- Vesaluoma, M., Kalso, S., Jokipii, L., Warhurst, D., Pönkä, A., Tervo, T., 1995. Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? *Br. J. Ophthalmol.* 79, 178–181. <https://doi.org/10.1136/bjo.79.2.178>
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>
- Visvesvara, G.S., Stehr-Green, J.K., 1990. Epidemiology of free-living ameba infections. *J. Protozool.* 37, 25S–33S. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1990.tb01142.x>
- Walker, M.J., Montemagno, C.D., Jenkins, M.B., 1998. Source water assessment and nonpoint sources of acutely toxic contaminants: A review of research related to survival and transport of *Cryptosporidium parvum*. *Water Resour. Res.* 34, 3383–3392. <https://doi.org/10.1029/98WR02286>
- Walochnik, J., Scheickl, U., Haller-Schober, E.-M., 2015. Twenty Years of *Acanthamoeba* Diagnostics in Austria. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62, 3–11. <https://doi.org/10.1111/jeu.12149>
- Wang, X., Ahearn, D.G., 1997. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* 34, 212–215. <https://doi.org/10.1007/s002849900170>
- Wanyiri, J., Ward, H., 2006. Molecular basis of *Cryptosporidium*-host cell interactions: recent advances and future prospects. *Future Microbiol.* 1, 201–208. <https://doi.org/10.2217/17460913.1.2.201>
- Watanabe, Y., Kimura, K., Yang, C.-H., Ooi, H.-K., 2005. Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocyst and *Giardia* sp. cyst in faucet water samples from cattle and goat farms in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 1285–1287. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.1285>
- Weitere, M., Bergfeld, T., Rice, S.A., Matz, C., Kjelleberg, S., 2005. Grazing resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms depends on type of protective mechanism, developmental stage and protozoan feeding mode. *Environ. Microbiol.* 7, 1593–1601. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00851.x>
- Widmer, G., Köster, P.C., Carmena, D., 2020. *Cryptosporidium hominis* infections in non-human animal species: revisiting the concept of host specificity. *Int. J. Parasitol.* 50, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.01.005>
- Widmer, G., Sullivan, S., 2012. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunol.* 34, 61–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01301.x>

- Wielinga, P.R., de Vries, A., van der Goot, T.H., Mank, T., Mars, M.H., Kortbeek, L.M., van der Giessen, J.W.B., 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int. J. Parasitol.* 38, 809–817. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.10.014>
- Willaert, E., Stevens, A.R., Healy, G.R., 1978. Retrospective identification of *Acanthamoeba culbertsoni* in a case of amoebic meningoencephalitis. *J. Clin. Pathol.* 31, 717–720. <https://doi.org/10.1136/jcp.31.8.717>
- Williams, M.M., Armbruster, C.R., Arduino, M.J., 2013. Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review. *Biofouling* 29, 147–162. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.757308>
- Williams, P., Lambert, P.A., Brown, M.R., Jones, R.J., 1983. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2181–2191. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-7-2181>
- Winiecka-Krusnell, J., Dellacasa-Lindberg, I., Dubey, J.P., Barragan, A., 2009. *Toxoplasma gondii*: Uptake and survival of oocysts in free-living amoebae. *Exp. Parasitol.* 121, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.022>
- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* 124, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>
- 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. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.72-97.2004>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature02977>
- Yadav, K.K., Mandal, A., Chakraborty, R., 2018. Biology of Bacterial Biofilms.
- Yan, L., Cerny, R.L., Cirillo, J.D., 2004. Evidence that hsp90 Is Involved in the Altered Interactions of *Acanthamoeba castellanii* Variants with Bacteria. *Eukaryot. Cell* 3, 567–578. <https://doi.org/10.1128/EC.3.3.567-578.2004>
- Yu, J.-R., Choi, S.-D., Kim, Y.-W., 2000. In vitro infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. *Korean J. Parasitol.* 38, 59–64. <https://doi.org/10.3347/kjp.2000.38.2.59>
- Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I., Ryan, U., 2015. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 5, 88–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.12.001>
- Zahedi, A., Ryan, U., 2020. *Cryptosporidium* – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Res. Vet. Sci.* 132, 500–512. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.002>
- Zardi, E.M., Picardi, A., Afeltra, A., 2005. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised hosts. *Chemotherapy* 51, 193–196. <https://doi.org/10.1159/000086920>

Zhang, N., Yu, X., Zhang, H., Cui, L., Li, Xiaou, Zhang, Xiaowei, Gong, P., Li, J., Li, Z., Wang, X., Li, Xin, Li, T., Liu, X., Yu, Y., Zhang, Xichen, 2020. Prevalence and Genotyping of *Cryptosporidium parvum* in Gastrointestinal Cancer Patients. *J. Cancer* 11, 3334–3339. <https://doi.org/10.7150/jca.42393>

Étude des interactions entre amibes libres et *Cryptosporidium* spp.

Résumé. Les amibes libres et *Cryptosporidium* spp. sont des parasites protozoaires qui peuvent être retrouvés dans le même environnement, hydrique par exemple. Ils peuvent donc potentiellement interagir entre eux. Il a été décrit que les amibes libres pouvaient phagocyter de nombreux micro-organismes. Certaines bactéries ainsi phagocytées sont capables de persister à l'intérieur des amibes libres en étant protégées du milieu extérieur. Si la capacité de phagocytose des amibes libres est bien décrite pour les bactéries, peu de données existent concernant les oocystes de *Cryptosporidium*. Le but de ce travail a été d'évaluer les interactions entre les oocystes de *C. parvum* et de *C. hominis* et deux espèces d'amibes libres communes dans l'environnement aquatique : *Acanthamoeba castellanii* et *Vermamoeba vermiformis*. Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. et les amibes libres ont été co-incubés en condition planctonique et de biofilm. La microscopie a été utilisée pour évaluer l'enkystement et la survie de amibes libres et pour dénombrer les oocystes. La phagocytose potentielle a été évaluée par des approches microscopiques complémentaires (immunofluorescence, microscopie confocale, microscopie électronique à transmission) et l'infectiosité des oocystes a été étudiée par CC-qPCR : une méthode basée sur la culture cellulaire associée à la PCR quantitative. Les amibes libres et *Cryptosporidium* spp. étant connus pour résister aux procédures classiques de désinfection de l'eau comme la chloration, l'effet de différents traitements de désinfection sur les interactions entre les microorganismes d'étude a été évalué grâce aux méthodes citées précédemment. Ce travail a pu montrer qu'il y avait bien des interactions entre les amibes libres et *C. parvum* mais qu'elles dépendaient des conditions d'études (conditions biofilm, souches en présence, température...). Une phagocytose occasionnelle de *C. parvum* par les amibes libres a été documentée. La co-incubation entre *C. parvum* et amibes libres n'a pas diminué de manière significative les concentrations en oocystes. Cependant, il a été observé une diminution de l'infectiosité des oocystes de façon transitoire en présence d'*A. castellanii*, diminution qui n'a pas été observée pour les oocystes de *C. hominis*. Il a été observé une tendance à une meilleure résistance des oocystes de *C. parvum* aux produits de désinfection en présence d'amibes libres. La résistance aux traitements de désinfection physique était proche entre *C. parvum* et amibes libres. De plus, la condition biofilm semble favoriser la persistance ou même la prolifération des oocystes dans le temps que ce soit pour *C. parvum* ou *C. hominis*. Cette thèse offre de nombreuses perspectives sur les interactions microbiennes entre *Cryptosporidium* species et amibes libres. A termes, il pourrait en résulter l'identification de gènes impliqués dans la virulence de *C. parvum* et dans sa résistance à la phagocytose. La condition biofilm pourrait jouer un rôle fondamental dans la survie voire même dans la prolifération des oocystes dans l'environnement. Dans certaines conditions, les amibes libres pourraient servir de modèle d'étude vis-à-vis de la réponse aux traitements de désinfection de type physique pour *Cryptosporidium* spp.

Mots clés : *Cryptosporidium*, amibes libres, infectiosité, phagocytose, *A. castellanii*, *V. vermiformis*, biofilm

Abstract: Free-living amoeba (FLA) and *Cryptosporidium* spp. are protozoan parasites sharing occasionally a same environment, in water for example. They can therefore potentially interact together. It has been described that free-living amoebae can phagocytosis many microorganisms. Some bacteria resist to phagocytosis and are protected from the environment inside FLA. While the phagocytosis capacity of free-living amoebae is well described for bacteria, few data exist regarding *Cryptosporidium* oocysts. Such interactions could modify the infectivity of *Cryptosporidium* species. The aim of this work was to evaluate the interactions between the oocysts of *C. parvum* and *C. hominis* and two species of common FLA found in water: *Acanthamoeba castellanii* and *Vermamoeba vermiformis*. Oocysts FLA were co-incubated in both planktonic and biofilm conditions. Potential interactions were evaluated overtime. Encystment and survival of FLA were assessed by microscopy using trypan blue vital coloration. Oocysts were enumerated by microscopy. Potential phagocytosis was assessed by complementary microscopic approaches (immunofluorescence, confocal microscopy, transmission electron microscopy) and oocyst infectivity was studied by CC-qPCR: a method based on cell culture combined with quantitative PCR. FLA and oocysts are known to resist to conventional water disinfection procedures such as chlorination. The effect of different disinfection treatments on these microorganisms was studied using the methods mentioned above. This work highlighted interactions between FLA and oocysts depending on the study conditions. Occasional phagocytosis of *C. parvum* has been documented. However, co-incubation between *C. parvum* and FLA did not significantly decrease oocyst concentrations. A transient decrease in oocyst infectivity was observed in the presence of *A. castellanii*, it was not observed for *C. hominis* oocysts. Oocysts appeared resistant to phagocytosis. For *C. hominis*, no change in infectivity was observed. A trend towards better resistance of *C. parvum* oocysts to disinfectant in presence of free-living amoebae has been observed. Resistance to physical disinfectant treatments was close between *C. parvum* and FLA. In addition, the biofilm condition seems to favor the persistence or even the proliferation of oocysts over time, whether for *C. parvum* or *C. hominis*. This thesis offers many perspectives on the microbial interactions between *Cryptosporidium* species and FLA. This could result in the identification of genes involved in the virulence of *C. parvum* in the future. The biofilm condition could play a fundamental role in the survival or even the proliferation of oocysts in the environment. Under certain conditions, free-living amoebae could serve as a study model regarding the response to physical-type disinfection treatments for *Cryptosporidium* species.

Key words: *Cryptosporidium*, Free-living-amoeba, infectivity, phagocytosis, *A. castellanii*, *V. vermiformis*, biofilm