

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNÉE 2006

**LA CRYPTOSPORIDIOSE DU CHEVREAU, DONNÉES
BIBLIOGRAPHIQUES ET ESSAI THÉRAPEUTIQUE
DE LA NITAZOXANIDE**

THÈSE

pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le

.....

Par

Hélène, Christine Michèle ROCQUES

Née le 24 décembre 1981 à Châtenay-Malabry (Essonne)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil

Membres

Directeur : M. POLACK

Maître de Conférences à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Assesseur : M. BOSSÉ

Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

REMERCIEMENTS

A mes parents et à ma petite sœur Mélanie, pour toute votre aide et votre patience,

A toute ma famille, je n'ai jamais manqué d'encouragements,

A Béatrice, Aurélie, Apolline, Sabine et tous les autres, pour votre amitié et votre soutien,

A Élodie, ma « grande sœur », qui me soutient depuis la prépa,

A Matthieu, pour ton aide informatique en ligne et tes encouragements,

A mon Pépé et à Khâlie, c'est grâce à vous si j'ai décidé de faire ce beau métier de vétérinaire.

A Henri VIEL, épidémiologiste au LERC, pour votre aide immense et votre bonne humeur tout au long de ce travail,

A Christophe CHARTIER, directeur du LERC, et à toute l'équipe du LERC, pour votre accueil et vos conseils,

A M. Bruno POLACK, maître de conférences à l'ENVA, et à M. Philippe BOSSÉ, professeur à l'ENVA, pour votre aide et votre disponibilité.

LA CRYPTOSPORIDIOSE DU CHEVREAU, DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES ET ESSAI THÉRAPEUTIQUE DE LA NITAZOXANIDE

ROCQUES Hélène

Résumé :

La cryptosporidiose est une protozoose zoonotique due à *Cryptosporidium parvum*. Chez le chevreau elle se traduit par des diarrhées aiguës entre 5 jours et 3 semaines d'âge. La morbidité et la mortalité sont élevées. Les conditions d'apparition de la maladie sont mal connues. La seule présence de *C. parvum* ne suffit pas et les facteurs environnementaux semblent jouer un rôle majeur.

Les possibilités thérapeutiques sont réduites actuellement.

La nitazoxanide est une molécule utilisée avec succès chez l'homme. Son effet n'est pas documenté chez les caprins, ce sera l'objet de cet essai thérapeutique. Deux lots de chevreaux infectés expérimentalement ont été traités par 200 et 100 mg/kg/jour de nitazoxanide pendant 7 jours. Ces traitements préventifs ont respectivement permis de réduire l'excrétion fécale d'ookystes de 39 et 30,5 % par rapport au témoin. Ils n'ont pas modifié le taux de mortalité ni la croissance.

Une toxicité aiguë de la molécule pour le chevreau a également été suspectée.

Mots-clés : Cryptosporidiose, *Cryptosporidium parvum*, nitazoxanide, thérapeutique, diarrhées néonatales, chevreau, caprin.



JURY :

Président : Pr.

Directeur : Dr. POLACK

Assesseur : Pr. BOSSÉ

Melle ROCQUES Hélène
18 rue LAMARTINE
91 400 ORSAY

CRYPTOSPORIDIOSIS OF GOAT KIDS, BIBLIOGRAPHICAL DATA AND NITAZOXANID THERAPEUTIC TEST

ROCQUES Hélène

Summary :

Cryptosporidiosis is a zoonotic disease caused by a protozoan parasite, *Cryptosporidium parvum*.

In goats it's considered as an economically important disease with clinical manifestations and death in kids.

The usual clinical course is acute diarrhea affecting kids from 5 days old to 3 weeks.

The conditions for occurrence of the disease are not clear. Environmental factors seem to play an important role.

Chemotherapeutic control agents presently available to treat the cattle are not really effective.

Nitazoxanid is an agent used to treat infected humans. It has not been tried on kids before.

Three groups of kids have been experimentally infected with *C. parvum* oocysts. Two of them have received nitazoxanid, 200 or 100 mg/kg/day, as a prophylaxy.

Both treatments have allowed to reduce respectively from 39 and 30,5 % the number of fecal oocysts, compared to the third group. Neither the mortality rate nor the kid's growth have been improved.

Nitazoxanid has been suspected of being toxic for kids.

Key words : Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium parvum*, nitazoxanid, therapeutic, neonatal diarrhoea, kid, goat.

JURY :

President: Pr.

Director: Dr. POLACK

Assessor: Pr. BOSSÉ

Miss ROCQUES Hélène

18 rue LAMARTINE

91 400 ORSAY

SOMMAIRE :

I. INTRODUCTION.....	9
II. LA CRYPTOSPORIDIOSE DU CHEVREAU : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	11
A. ETIOLOGIE.....	11
1. <i>Systématique.....</i>	<i>11</i>
2. <i>Cryptosporidies des ruminants.....</i>	<i>14</i>
3. <i>Cycle biologique de C. parvum.....</i>	<i>14</i>
4. <i>Propriétés physico-chimiques.....</i>	<i>16</i>
B. EPIDÉMIOLOGIE.....	16
1. <i>Répartition géographique.....</i>	<i>16</i>
2. <i>Prévalence.....</i>	<i>16</i>
3. <i>Espèces cibles.....</i>	<i>17</i>
4. <i>Sources et mode de transmission du parasite.....</i>	<i>17</i>
5. <i>Critères de sensibilité de l'hôte.....</i>	<i>19</i>
a) <i>L'espèce.....</i>	<i>19</i>
b) <i>L'âge.....</i>	<i>19</i>
c) <i>Le statut immunitaire.....</i>	<i>19</i>
6. <i>Facteurs de risque.....</i>	<i>21</i>
C. PATHOGÉNIE.....	24
D. SIGNES CLINIQUES.....	24
E. DIAGNOSTIC.....	25
1. <i>Sur l'animal vivant.....</i>	<i>25</i>
a) <i>Diagnostic épidémiologique et clinique.....</i>	<i>25</i>
b) <i>Diagnostic différentiel.....</i>	<i>26</i>
c) <i>Diagnostic de laboratoire.....</i>	<i>27</i>
d) <i>Les kits de diagnostic rapide.....</i>	<i>29</i>
2. <i>Diagnostic nécropsique.....</i>	<i>30</i>
F. TRAITEMENT ET PRÉVENTION.....	31
1. <i>Traitement symptomatique.....</i>	<i>31</i>
a) <i>Réhydrater.....</i>	<i>31</i>
b) <i>Lutter contre la maldigestion.....</i>	<i>31</i>
c) <i>Protéger la muqueuse intestinale.....</i>	<i>32</i>
d) <i>Prévenir les surinfections.....</i>	<i>32</i>

2. Contrôle hygiénique.....	32
3. Arsenal thérapeutique.....	33
a) Molécules.....	33
III. ESSAI THÉRAPEUTIQUE : LA NITAZOXANIDE CONTRE LA CRYPTOSPORIDIOSE DU CHEVREAU.....	83
A. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	83
1. Les chevreaux.....	83
2. La prise en charge des animaux à la station.....	83
a) Logement.....	83
b) Ambiance.....	84
c) Alimentation.....	84
3. La molécule testée : la nitazoxanide.....	84
a) Médicament utilisé.....	84
b) Dose et durée du traitement.....	84
c) Rythme d'administration.....	86
4. L'inoculum de <i>C. parvum</i>	86
5. Protocole de l'essai	87
6. Outils statistiques.....	89
B. RÉSULTATS	90
1. L'excrétion fécale d'ookystes.....	91
a) Description.....	91
b) Analyse.....	96
2. Suivi du poids.....	97
a) Description.....	97
b) Analyse.....	100
3. Suivi de la mortalité.....	101
a) Description	101
b) Analyse.....	108
C. DISCUSSION.....	111
1. Le matériel.....	111
2. Le protocole.....	111
3. Les résultats de l'essai.....	112
4. Hypothèses sur la probable action toxique de la nitazoxanide.....	113
IV. CONCLUSION.....	116

Annexes

<u>Annexe 1</u> : Cycle de <i>Cryptosporidium parvum</i>	105
<u>Annexe 2</u> : Cycle d' <i>Eimériidés</i>	106
<u>Annexe 3</u> : Méthode de Ziehl-Neelsen modifiée	107
<u>Annexe 4</u> : Méthode de Heine	108
<u>Annexe 5</u> : Méthode de flottation au saccharose	109
<u>Annexe 6</u> : Plan de la chèvrerie à l'AFSSA site de Niort	110
<u>Annexe 7</u> : Autorisation d'importation et d'utilisation de NAVIGATOR IDDEX, PATE	111
<u>Annexe 8</u> : Composition (n°, âges, sexes, poids) des 3 lots de chevreaux le 01/02/05	112
<u>Annexe 9</u> : Scores d'excrétion fécale d'ookystes par jour et par chevreau, dans les 3 lots	115
<u>Annexe 10</u> : Résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids dans les 3 lots	118
<u>Annexe 11</u> : Date des morts et numéros des chevreaux concernés	121
<u>Annexe 12</u> : Résultats des autopsies et analyses bactériologiques	122

Tableaux et figures

Tableau 1 : Les espèces de *Cryptosporidium* et leurs hôtes principaux

Tableau 2 : Intensité de l'infection et pourcentage de souriceaux infectés par *C. parvum* dans chaque lot (témoin et traités par de la β -cyclodextrine) de l'essai de CASTRO-HERMIDA *et al.* (2000a)

Tableau 3 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Moyennes quotidiennes x 100 des scores individuels d'excrétion fécale d'ookystes dans chaque lot de chevreaux

Tableau 4 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Fréquence de chaque score sur la totalité des coproscopies de l'essai, dans chaque lot

Tableau 5 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Poids moyen en kg des chevreaux de chaque lot lors de chaque pesée

Tableau 6 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Gain de poids moyen (en kg) des chevreaux, entre deux pesées, dans les trois lots

Tableau 7 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Nombre de chevreaux morts dans le lot 1, par jour

Tableau 8 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Nombre de chevreaux morts dans le lot 2, par jour

Tableau 9 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Nombre de chevreaux morts dans le lot 3, par jour

Tableau 10 : Base pour le test de Fisher destiné à chercher une influence de la cryptosporidiose sur l'ensemble des mortalités dans le lot 1

Tableau 11 : Base pour le test de Fisher destiné à chercher une influence de la cryptosporidiose sur les mortalités de J7 à J23 dans le lot 1

Tableau 12. Base pour le test de Fisher destiné à chercher une influence de la cryptosporidiose sur les mortalités dans le lot 3

Figure 1 : Courbes d'évolution dans le temps des excréctions moyennes d'ookystes (score 0 : absence d'ookystes observés, à 5 : plus de 20 ookystes par champ, à l'objectif x 25) du lot témoin et du lot traité en curatif avec le lactate d'halofuginone (HALOCUR ND), de l'essai de NACIRI *et al.* (1999)

Figure 2 : Courbes d'évolution dans le temps des excréctions moyennes d'ookystes (score 0 : absence d'ookystes observés, à 5 : plus de 20 ookystes par champ, à l'objectif x 25) du lot témoin et du lot traité préventivement avec le lactate d'halofuginone (HALOCUR ND), de l'essai de NACIRI *et al.* (1999)

Figure 3 : Courbes d'évolution dans le temps des scores fécaux moyens (score 0 : selles normales, score 1 : diarrhée semi-liquide, score 2 : diarrhée liquide) du lot témoin et du lot traité préventivement avec le lactate d'halofuginone (HALOCUR ND), de l'essai de NACIRI *et al.* (1999)

Figure 4 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Courbes d'évolution quotidienne des moyennes (x 100) des scores d'excrétion fécale d'ookystes dans chaque lot de chevreaux

Figure 5 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme de fréquence des scores d'excrétion dans chaque lot de chevreaux

Figure 6 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Courbes d'évolution du poids moyen des chevreaux (en kg) dans chaque lot, entre J1 et J23

Figure 7 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme des gains de poids moyens des chevreaux entre deux pesées (en kg) dans les 3 lots

Figure 8 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme de répartition dans le temps des morts du lot 1 traité avec 200 mg/kg/jour de nitazoxanide (NAVIGATOR ND)

Figure 9 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme de répartition dans le temps des morts du lot 2 traité avec 100 mg/kg/jour de nitazoxanide (NAVIGATOR ND)

Figure 10 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de

0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme de répartition dans le temps des morts du lot 3 (lot témoin)

I. Introduction

La cryptosporidiose est une protozoose responsable d'importantes pertes économiques en élevages caprins. Les chevreaux âgés de 5 à 21 jours sont particulièrement sensibles à cette maladie diarrhéique, caractérisée par une morbidité et une mortalité élevées.

La cryptosporidiose peut être partiellement prévenue par des mesures d'hygiène très strictes mais celles-ci ne sont pas infaillibles compte tenu des caractéristiques biologiques du parasite (cycle rapide, forte résistance des ookystes) et des incertitudes qui persistent aujourd'hui sur les mécanismes d'apparition de la maladie.

Les possibilités thérapeutiques sont réduites également. Plus de 100 molécules ont été testées mais aucune ne permet un contrôle parfait de la maladie.

L'importance de la cryptosporidiose n'est pas moindre en matière de santé publique.

La cryptosporidiose est une zoonose. Elle affecte particulièrement gravement les personnes immunodéprimées.

Les ookystes de *Cryptosporidium parvum* sont massivement excrétés dans les fèces d'animaux infectés. Ces ookystes sont très résistants dans le milieu extérieur et peuvent être ingérés accidentellement par des humains.

La plupart des épidémies ont pu être reliées à l'ingestion d'eau contaminée par des ookystes de *Cryptosporidium parvum*. (FAYER 2004, ANONYME 2005a)

Aucune molécule n'assure un contrôle idéal de la cryptosporidiose chez les personnes immunodéprimées. La paromomycine et la nitazoxanide sont actuellement les molécules les plus efficaces dans ce contexte.

La paromomycine a été testée chez le chevreau, elle a donné des résultats prometteurs mais toujours partiels.

La nitazoxanide n'a donné lieu à aucun essai publié chez les ruminants. Il était donc intéressant de la tester sur de jeunes chevreaux infectés expérimentalement par *Cryptosporidium parvum*. Cet essai a été réalisé au Laboratoire d'Etudes et de Recherches Caprines (LERC) qui est un laboratoire de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), situé à Niort (79).

Le LERC a deux missions principales : développer les recherches sur les caprins afin d'améliorer les performances de la filière et réduire les risques que peuvent représenter les

caprins pour la santé publique vétérinaire (thématique majeure pour l'AFSSA).

La recherche d'un traitement efficace contre la cryptosporidiose dans les élevages caprins répond donc aux deux missions principales de l'AFSSA site de Niort : limiter les pertes économiques en élevage et atténuer la contamination de l'environnement (l'eau en particulier) par les fèces très chargées en parasites chez les animaux infectés.

La présentation de cet essai thérapeutique fera suite à une synthèse bibliographique sur la cryptosporidiose et les pistes thérapeutiques actuelles.

II. La cryptosporidiose du chevreau : données bibliographiques

A. Etiologie

1. Systématique

La connaissance sur la taxonomie du genre *Cryptosporidium* et l'identification des espèces reposent sur les outils récents de la biologie moléculaire. De nouvelles données viennent constamment compléter ou corriger l'état actuel des connaissances concernant la systématique de *Cryptosporidium*, qui fait encore l'objet de publications quasi mensuelles.

Cryptosporidium est un protozoaire de l'embranchement des *Apicomplexa*.

On a longtemps pensé que *Cryptosporidium* était apparenté aux coccidies, en raison des nombreuses similitudes de leur cycle biologique. Cependant *Cryptosporidium* ne semble pas posséder d'organelle « *mitochondria-like* », retrouvé chez les coccidies classiques.

Les données de la biologie moléculaire laissent penser que *Cryptosporidium* serait davantage apparenté aux grégarines et aux bactéries du genre *Helicobacter*. (FAYER 2004)

Actuellement, 14 espèces de *Cryptosporidium* sont répertoriées. Elles figurent, ainsi que leurs hôtes principaux, dans le tableau 1 ci-dessous. :

Tableau 1 : Les espèces de *Cryptosporidium* et leurs hôtes principaux

Espèces	Hôte principal
<i>C. andersoni</i>	Bétail et camélidés
<i>C. baileyi</i>	Oiseaux
<i>C. canis</i>	Chiens
<i>C. felis</i>	Chats
<i>C. hominis</i>	Humains et singes
<i>C. meleagridis</i>	Oiseaux et humains
<i>C. muris</i>	Rongeurs et camélidés
<i>C. nesorum</i>	Poissons
<i>C. parvum</i>	Humains et les autres mammifères
<i>C. saurophilium</i>	Reptiles
<i>C. serpentis</i>	Serpents
<i>C. wrairi</i>	Cobayes
<i>C. galli</i>	Oiseaux
<i>C. suis</i>	Porcs

(APPELBEE *et al.* 2005)

Fayer (2004) évoque une quinzième espèce, *C. molnari*, parasite de poissons.

Cryptosporidium parvum semble avoir l'éventail d'hôtes le plus large et est le plus couramment incriminé dans les infections de l'homme et du bétail.

Il aurait été retrouvé chez plus de 150 espèces de mammifères. Cependant, dans la plupart des cas, le parasite a été identifié comme étant *C. parvum*, sur des critères morphologiques des ookystes retrouvés. Ces critères sont en fait insuffisants et seule la biologie moléculaire permettra de préciser s'il s'agit de sous types de *C. parvum* ou d'espèces distinctes comme cela a été le cas pour *C. hominis* (ex *C. parvum* génotype 1) et *C. canis* (ex *C. parvum* génotype « chien »). (FAYER 2004)

Les autres espèces de *Cryptosporidium* ont une plus forte spécificité d'hôte mais cette

spécificité n'est pas stricte. (APPELBEE *et al.* 2005)

2. Cryptosporidies des ruminants

Seules deux espèces de *Cryptosporidium* parasitent classiquement les ruminants. (NACIRI 1994)

La première, *Cryptosporidium andersoni*, peut être retrouvée dans la caillette de ruminants jeunes ou adultes, elle serait responsable d'une gastrite chronique chez des bovins de tout âge. (CHARTIER 1999)

La seconde, *Cryptosporidium parvum*, est l'agent de diarrhées néonatales. (NACIRI 1994)

Les petits ruminants hébergeraient le même type que les bovins.

3. Cycle biologique de *C. parvum*

Toutes les espèces de *Cryptosporidium* sont des parasites intracellulaires obligatoires (FAYER 2004).

C'est un parasite monoxène qui peut effectuer son cycle évolutif en trois ou quatre jours. (MATTHEWS 1991)

L'ookyste est le seul stade parasitaire retrouvé dans l'environnement. Une fois ingéré par l'hôte, l'ookyste excyste et libère 4 sporozoïtes mobiles qui parasitent les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. Les stades parasitaires suivants sont intracellulaires, mais « extracytoplasmiques » ; ils évoluent dans une vacuole parasitophore dépendante de la membrane plasmique de la bordure en brosse.

Le cycle du parasite (*annexe 1 : cycle de *Cryptosporidium parvum**) est proche d'un cycle classique de coccidie (*annexe 2 : cycle d'Eimériidés*) avec toutefois deux différences majeures qui confèrent à la cryptosporidiose un caractère « explosif » :

- ▶ L'ookyste de *C. parvum* émis dans le milieu extérieur est sporulé et donc directement infectant pour un autre animal.

- ▶ Environ 20 % des ookystes produits dans l'intestin d'un hôte peuvent éclore *in situ* et ré-infecter ce même hôte directement. (CHARTIER 2002a, NACIRI 1994)

4. Propriétés physico-chimiques

Les ookystes sont très résistants dans le milieu extérieur.

Les variations de températures naturelles et de nombreux désinfectants classiques n'inhibent pas leur pouvoir infectant.

En revanche, la dessiccation, est efficace ainsi que l'ammoniaque (5 %), l'eau oxygénée (3 %) et le formol (10 %). (CHAMBON 1990, SMITH et SHERMAN 1994, CHARTIER 2002a).

Concernant le risque de contamination lié à l'eau ; il faut savoir que le chlore utilisé en routine n'altère pas (ou très peu) la viabilité des ookystes (et la filtration de l'eau n'élimine pas les ookystes). L'ozone et les rayons ultraviolets se sont par contre montrés efficaces. Les ookystes peuvent également survivre dans l'eau de mer. (FAYER 2004)

B. Epidémiologie

1. Répartition géographique

Le parasite est retrouvé dans le monde entier. (APPELBEE *et al.* 2005, CHARTIER 2001a)

2. Prévalence

C. parvum est très répandue en élevage caprin mais les données chiffrées de prévalence sont très variables selon les enquêtes et les méthodes utilisées pour la recherche du parasite.

Une étude réalisée dans les Deux Sèvres, en 2003, sur 879 chevreaux âgés de 5 à 30 jours et issus de 60 cheptels tirés au sort –donc avec ou sans animaux diarrhéiques- montre un

portage d'ookystes pour 16,2 % des chevreaux. (DELAFOSSÉ *et al.* 2003)

53,3 % des cheptels avaient au moins un positif.

Les ookystes étaient alors recherchés par la méthode de HEINE et sur fèces non concentrées.

Ce n'est pas la technique la plus sensible.

La prévalence réelle de *C. parvum* est certainement plus élevée. (DELAFOSSÉ *et al.* 2003)

Le LERC a d'ailleurs estimé cette prévalence à 55 % des chevreaux.

La prévalence de la cryptosporidiose-maladie est toujours moindre. (CHAMBON 1990)

3. Espèces cibles

C. parvum a été identifiée majoritairement chez les ruminants puis la souris, les chevaux, les humains et de nombreux autres mammifères. (FAYER 2004)

Les humains sont essentiellement infectés par *C. hominis* et *C. parvum*. L'agent de la cryptosporidiose du chevreau est donc zoonotique. (APPELBEE *et al.* 2005)

4. Sources et mode de transmission du parasite

La contamination par des cryptosporidies s'effectue par l'ingestion d'ookystes émis dans les fèces d'animaux contaminés.

Ces ookystes sont ingérés lors de la consommation d'aliments ou d'eau souillés, par léchage du pelage, de la litière, etc.

Les ookystes émis dans les fèces de veaux sont infectants pour les chevreaux et vice versa. (Même génotype incriminé)

Les animaux adultes, très rarement malades, jouent pourtant un rôle de réservoir de parasites en raison de l'excrétion résiduelle, qui s'accroît autour de la mise bas. (CHARTIER 2002a, NOORDEN *et al.* 2002, CASTRO-HERMIDA *et al.* 2005) Cette excrétion reste inférieure à celle retrouvée chez les jeunes malades : elle a été évaluée à $1,6 \times 10^5$ ookystes par jour chez une chèvre adulte autour du part, contre $3,6 \times 10^8$ ookystes par jour chez un chevreau malade. Un autre réservoir est l'environnement contaminé par des ookystes très résistants. (CHARTIER 2002a)

Pour certains auteurs, les rongeurs représentent également un réservoir non négligeable. (MILLEMAN *et al.* 2003, FAYER 2004)

Les mouches et le matériel utilisé au contact des animaux peuvent assurer la transmission d'ookystes. (MOORE *et al.* 2003)

5. Critères de sensibilité de l'hôte

a) L'espèce

Les chevreaux sont les ruminants nouveau-nés les plus sensibles à l'infection par *C. parvum*. L'expression clinique est beaucoup plus constante et intense que chez le veau ou l'agneau. (CHARTIER 2002a)

Dans les cheptels caprins atteints la morbidité atteint fréquemment les 80 % et la mortalité peut dépasser les 50 %. (CHARTIER 2001a)

Des épisodes de cryptosporidiose avec 100 % de mortalité ont été décrits. (DELAFOSSÉ *et al.* 2003)

b) L'âge

La maladie s'observe essentiellement chez les jeunes ruminants âgés de cinq jours à trois semaines. (CHARTIER 2002a, DUBEY *et al.* 1990)

Il est admis que les animaux s'infectent dès la naissance. L'excrétion fécale d'ookystes débute autour de quatre jours d'âge, atteint un pic vers sept jours puis décline à partir du début de la troisième semaine. L'évolution des signes cliniques se superpose à celle de l'excrétion. (CHARTIER 2001a)

C. parvum génère une forte immunité après la primo-infection. (CHARTIER 2002a)

c) Le statut immunitaire

Toute affection débilante est susceptible d'accroître la sensibilité. En médecine humaine, il est clair que le statut immunitaire joue un rôle fondamental sur la gravité et la durée de la maladie. (CHAMBON 1990, NACIRI 1994, FAYER 2004)

Chez le jeune ruminant, la relation entre la maladie et la qualité de l'immunité passive n'est pourtant pas démontrée. La prise du colostrum serait associée à une moindre excrétion fécale d'ookystes mais elle n'empêche pas la maladie. (RADOSTIS *et al.* 2000).

Il est possible que l'alimentation joue également sur la sensibilité : un déficit énergétique (déficit quantitatif ou qualitatif en lait ou colostrum) augmente le taux de mortalité en élevage

infecté. (RADOSTIS *et al.* 2000).

6.Facteurs de risque

Les conditions d'apparition de la cryptosporidiose-maladie chez les animaux infectés sont dans l'ensemble mal connues.

La cryptosporidiose « explose » dans certains élevages alors qu'elle touche les autres beaucoup moins gravement, voire pas du tout. (CHARTIER 2002a)

Un petit nombre d'ookystes (<50) peut suffire à infecter un veau. (MOORE *et al.* 2003)

Cependant, la maladie survient essentiellement au cours de la seconde moitié des mises bas ce qui correspond à un environnement de plus en plus contaminé. (NACIRI 1994, CHARTIER 2001a)

C'est aussi à ce moment que les « explosions » de cryptosporidiose caractérisées par une morbidité et une mortalité très élevées sont observées. (SMITH et SHERMAN 1994)

Un environnement modérément contaminé est susceptible d'initialiser l'infection des jeunes mais il ne semble pas suffisant pour déclencher la cryptosporidiose. L'apparition de la cryptosporidiose passe par une phase d'amplification du parasite qui se produit chez les jeunes. Seule cette amplification peut conduire à une contamination massive de l'environnement qui explique l'infection lourde des nouveau-nés suivants et l'éclosion de la maladie. (CHARTIER 2001a, CHARTIER 2002a, DELAFOSSE *et al.* 2003)

Le risque d'apparition de la cryptosporidiose-maladie se situe donc à plusieurs niveaux :

- ▶ Lorsque l'infection des premiers jeunes est favorisée

Ce risque n'est pas simple à maîtriser car un petit nombre d'ookystes peut suffire à initier l'infection.

Cependant, MOORE *et al.* (2003) ont montré que lors d'inoculations uniques d'ookystes à des veaux, la durée de l'excrétion, le nombre total d'ookystes excrétés et donc la contamination de l'environnement étaient supérieurs lors d'inoculats plus riches en ookystes.

Il est donc important de minimiser l'infection chez les premiers jeunes pour limiter l'évolution de la contamination de l'environnement par la suite.

- ▶ Lorsque l'accumulation des ookystes dans l'environnement n'est pas maîtrisée

au fil du temps

Une densité animale trop élevée, un défaut dans l'entretien des locaux ou dans la gestion des lots (litière sale, non séparation des malades, etc.) favorise la contamination massive de l'environnement. (DELAFOSSÉ *et al.* 2003)

► Lorsque le niveau d'amplification du parasite chez le jeune est élevé

Les mécanismes de cette amplification sont mal compris. La présence d'autres agents entéropathogènes pourrait favoriser cette amplification. Elle dépend aussi certainement de facteurs environnementaux non élucidés. (CHARTIER 2001a, CHARTIER 2002, DELAFOSSÉ *et al.* 2003)

► Lors d'affections concomitantes

On a longtemps pensé que *C. parvum* était une cause mineure de diarrhées, tout juste susceptible de compliquer une infection virale ou bactérienne. Ce n'est qu'en 1971 que son rôle dans un cas de diarrhée bovine a été reconnu pour la première fois. (FAYER 2004)

Il est aujourd'hui considéré comme un agent étiologique majeur des diarrhées néonatales chez les ruminants mais il n'est pas rare d'avoir à faire à des associations d'agents entéropathogènes. (MOLINA *et al.* 1994)

Ces infections mixtes seraient plus fréquentes et plus graves que les infections à *C. parvum* seule. (CHARTIER 2002a, RADOSTIS *et al.* 2000)

La cryptosporidiose coïncide surtout, dans le temps, avec les rotaviroses et coronaviroses. De telles associations sont fréquentes et un effet synergique existerait entre ces différents agents pathogènes.

La synergie rotavirus-*C. parvum* en particulier s'explique comme suit : le rotavirus altère les capacités digestives et absorbantes du jéjunum. Une compensation iléale peut atténuer les signes cliniques, à moins que l'iléon ne soit lui même endommagé par une infection à *C. parvum*. (NACIRI 1994)

La co-infection transforme ainsi une infection subclinique en infection clinique.

D'autres associations ont été observées : *C. parvum* et *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, mais leurs interactions n'ont pas été démontrées. Il est néanmoins évident que l'infection par un de ces agents pathogènes affaiblit l'animal qui se défendra moins efficacement face à une deuxième infection. (NACIRI 1994, RADOSTIS *et al.* 2000)

► Certains auteurs notent un effet saison : il y aurait plus de cas en hiver.

Cette observation connaît plusieurs explications. L'hiver correspond à une période où les animaux sont plus confinés, en particulier pour les troupeaux qui pâturent mais aussi car c'est à ce moment que la litière peut manquer. Cette explication rejoint la notion de contamination massive de l'environnement.

Pour d'autres, l'hiver est une période où le froid et le manque d'alimentation altèrent la résistance des animaux, il y aurait alors davantage de mortalité. (NACIRI 1994)

Il faut aussi noter que l'hiver coïncide simplement avec les chevrotages...

C. Pathogénie

C. parvum parasite la bordure en brosse des entérocytes, il se situe dans une vacuole parasitophore issue de la membrane plasmique et des microvillosités.

Sa multiplication aboutit à la destruction des microvillosités de l'iléon, à l'origine d'une malabsorption.

Un processus sécrétoire (inflammatoire), dû à une production accrue de prostaglandines au niveau de la muqueuse et à l'hyperplasie des cryptes, renforce la diarrhée, par exsudation.

Ces phénomènes expliquent la diarrhée et la perte de poids observées.

(CHAMBON 1990, SMITH et SHERMAN 1994, CHARTIER 2002a, FAYER 2004)

Compte tenu de l'abondance de la diarrhée observée chez certains individus, l'existence d'une entérotoxine produite par le parasite, est suspectée. (FAYER 2004)

D. Signes cliniques

La cryptosporidiose se manifeste classiquement par une diarrhée aiguë, aqueuse, blanche à jaunâtre chez des chevreaux de 5 jours à 3 semaines. La diarrhée peut être plus ou moins muqueuse mais elle est rarement sanglante.

Cette diarrhée dure habituellement de quelques jours à deux semaines, parfois plus, en raison des possibles ré-infections (auto-infections). Elle peut se maintenir sur toute la période de la maladie ou s'arrêter puis reprendre.

Son intensité est variable de même que les degrés de déshydratation et déséquilibres électrolytiques ou acido-basiques qui en découlent.

Les chevreaux peuvent être anorexiques, apathiques, leur pelage est terne mais ils sont habituellement apyrétiques.

L'évolution est tout aussi variable, les chevreaux peuvent guérir spontanément ou mourir. Il n'y a par contre pas de passage à la chronicité.

L'amaigrissement est habituellement très marqué, mais les animaux guéris développent

souvent une croissance compensatrice, d'autres restent des « non valeurs économiques ». (DUBEY *et al.* 1990, SMITH et SHERMAN 1994, CHARTIER 2002, FAYER 2004)

Deux autres formes cliniques de la cryptosporidiose ont été observées (CHARTIER 2002a) :

- ▶ Une forme sans diarrhée, mais avec émaciation progressive a été décrite dans un lot de chevreaux âgés d'une semaine; elle conduit à la mort en quelques jours.
- ▶ Une autre forme avec diarrhée a été observée chez des chevreaux plus âgés (6 semaines), les animaux guérissent en une dizaine de jours.

Chez les sujets en âge d'être malade, le nombre de porteurs sains n'est pas connu mais semble élevé. La gravité de la diarrhée est généralement corrélée à l'intensité de l'excrétion fécale d'ookystes. Certains sujets fortement excréteurs sont néanmoins asymptomatiques et réciproquement. (CHARTIER 2002a)

En conditions expérimentales, la diarrhée peut être absente et remplacée par de la constipation. (CHARTIER 2002a)

Les adultes sont presque toujours asymptomatiques bien que des formes cliniques aient été décrites à titre exceptionnel chez des chèvres adultes (CHARTIER 2002a)

E.Diagnostic

1.Sur l'animal vivant

a)Diagnostic épidémiologique et clinique

Les données épidémiologiques et cliniques permettent d'aboutir à une suspicion mais certainement pas à une certitude.

L'apparition de diarrhées plutôt sévères sur des chevreaux âgés de 5 à 20 jours, au cours de la

seconde moitié des mises bas est un bon signe d'appel.

Cette diarrhée n'a en revanche rien qui la distingue vraiment des autres diarrhées néonatales. (CHARTIER 2002a)

En présence de diarrhées néonatales avec morbidité et mortalité importante, le recours aux antibiotiques est fréquent. Chez le chevreau, les diarrhées à *Escherichia coli* sont pourtant moins fréquentes que les diarrhées virales ou à cryptosporidies. Les antibiotiques s'avèrent alors inefficaces, ce qui peut orienter le diagnostic. (LE GUILLOU 2002)

b)Diagnostic différentiel

Toutes les causes nutritionnelles ou infectieuses du complexe des diarrhées néonatales des ruminants entrent dans le diagnostic différentiel.

Chez le chevreau, aucun agent pathogène n'est retrouvé dans 20 % des diarrhées épizootiques et la conduite alimentaire semble jouer un rôle important. (MILLEMANN *et al.* 2003)

Les agents infectieux sont nombreux également, il s'agit :

▶ des colibacilles :

La colibacillose proprement dite provoque une diarrhée liquide, jaunâtre et de l'hyperthermie au cours des 5 premiers jours de vie. Les chevreaux touchés sont nombreux et plutôt dans la seconde moitié des mises bas. (MILLEMANN *et al.* 2003)

Il est vrai que la cryptosporidiose touche souvent des animaux un peu plus âgés mais en fin d'épizootie les chevreaux sont malades de plus en plus tôt, dès le quatrième jour de vie. (LE GUILLOU 2002)

Le syndrome du chevreau mou, d'origine colibacillaire, se caractérise par une grande faiblesse chez des chevreaux de 8 à 10 jours, de la diarrhée peut éventuellement s'observer. (MILLEMANN *et al.* 2003)

▶ des virus (rotavirus, coronavirus, ...)

Ils provoquent de la diarrhée liquide au cours de la première semaine de vie, les animaux guérissent spontanément en quelques jours, sauf en cas de surinfections. Il y a plusieurs malades et plutôt en deuxième partie des mises bas.

▶ *Clostridium perfringens* type B,

Cette toxi-infection se caractérise par des symptômes d'entérite hémorragique aiguë avant l'âge de trois semaines. Elle touche souvent les plus beaux chevreaux du lot. L'évolution est toujours très rapide et conduit souvent à la mort. L'affection a souvent pour origine un défaut dans l'allaitement artificiel et concerne plusieurs animaux.

▶ *Salmonella*,

Plusieurs caprins de tous les âges présentent de la diarrhée verdâtre ou hémorragique, ils sont très abattus, fiévreux. Des cas de morts subites peuvent survenir. La salmonellose apparaît préférentiellement en fin de période de mises bas. Elle est rare en France. (MILLEMANN *et al.* 2003)

▶ *Giardia duodenalis*

La giardiose se manifeste classiquement par une diarrhée pâteuse, un amaigrissement et de l'abattement chez des animaux âgés de 5 à 10 semaines. (CASTRO-HERMIDA *et al.* 2005)

Le diagnostic différentiel est donc visiblement complexe sachant qu'en plus les chevreaux peuvent être victimes d'infections mixtes.

La description des diarrhées figure à titre d'information, elle n'est pas une règle.

Le recours au laboratoire est indispensable. (CHARTIER 2002a, MILLEMANN *et al.* 2003, SMITH et SHERMAN 1994, RADOSTIS *et al.* 2000)

c)Diagnostic de laboratoire

Il repose sur la mise en évidence d'ookystes dans les matières fécales. Ces ookystes mesurent 4 à 5 microns de diamètre. (ANONYME 2001)

La présence d'ookystes n'est certes pas synonyme de cryptosporidiose mais il existe une forte corrélation entre la quantité d'ookystes excrétés et l'existence ou l'intensité des diarrhées. (CHARTIER 2002a, DELAFOSSE *et al.* 2003)

Les matières fécales peuvent être prélevées dans le rectum ou sur le sol. (CHARTIER 2002a)

Différentes techniques existent.

(1) Les techniques d'étalement sur lame et coloration

Ces techniques de colorations sont simples et peu onéreuses. Elles requièrent un œil exercé. Le diagnostic de routine est souvent fait avec ces méthodes étant donné le haut niveau d'excrétion d'ookystes chez les animaux diarrhéiques atteints de cryptosporidiose. (POLACK *et al.* 1983, CHARTIER *et al.* 2002)

(a) Méthode de Henriksen modifiée, aussi appelée Ziehl-Neelsen modifiée

La coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (*Annexe 3 : méthode de la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée*) permet de visualiser les ookystes colorés par la fuchsine, ils apparaissent rouges sur fond bleu. (ANONYME 2001) C'est la méthode de référence. (CHAMBON 1990, CHARTIER *et al.* 2002)

Certaines structures risquent d'être confondues avec les ookystes :

- des levures, elles sont en fait plus grosses que les ookystes (6 à 10 microns) et de couleur bleue
- des globules de graisse
- des éléments bactériens (plus petits)
- des grains d'amidons, rouges et ronds avec des cercles concentriques
- des dépôts de fuchsine, rouges et sans structures internes

(CHAMBON 1990, CASEMORE 1991, CHARTIER *et al.* 2002)

C'est une méthode semi-qualitative. (CHARTIER *et al.* 2002)

(b) Méthode de Heine

La méthode de Heine (*Annexe 4 : méthode de Heine*) est la méthode utilisée au Laboratoire d'Études et Recherches Caprines de Niort.

Les ookystes apparaissent brillants sur un fond rouge et plus sombre. (ANONYME 2001)

Ils ne doivent pas être confondus avec des bulles d'air, réfringentes également, mais sans structures internes.

Les lames doivent être lues rapidement (dans les 15 minutes), la réfringence s'atténue et disparaît ensuite. (CHAMBON 1990)

La lecture est nettement plus facile en microscopie à contraste de phase. Ce matériel n'est pas toujours très répandu ce qui constitue une des limites d'utilisation de la méthode.

La méthode peut apporter des informations semi-quantitatives. Le comptage des ookystes permet d'obtenir un score : une + correspond à « moins d'un ookyste par champ à l'objectif x 40 » et 4 + à plus de « 20 ookystes par champ » avec le même objectif. (DELAFOSSÉ *et al.* 2003)

(2) Les techniques de concentration

Elles sont plus sensibles que les précédentes.

Parmi ces techniques, la flottation en solution de saccharose saturée est la plus utilisée. (*Annexe 5 : méthode de la flottation au saccharose*).

Une quantification est possible par comptage des ookystes en cellule de Thoma. (CHARTIER *et al.* 2002)

La lecture doit se faire immédiatement après la préparation de la lame et suppose un œil averti. (CHAMBON 1990)

Ces trois méthodes sont les plus classiquement utilisées. Elles ne sont pas lourdes à mettre en œuvre et leur niveau de sensibilité est suffisant sur des animaux diarrhéiques.

Les techniques d'immuno-marquage, immunofluorescence et ELISA ont une haute sensibilité et une bonne spécificité. Leur réalisation est plus lourde.

(CHARTIER *et al.* 2002)

d) Les kits de diagnostic rapide

Des kits de diagnostic rapide par immunochromatographie ont été mis au point récemment par le laboratoire BVT, pour détecter les agents pathogènes majeurs des diarrhées néonatales chez le veau. (Speed® V-Diar 4 et Speed® V-Diar 5)

Les antigènes du Coronavirus, du Rotavirus, du pili K99 et de l'adhésine CS31 A d'*E. coli* et de l'ookyste de *C. parvum* peuvent être mis en évidence par immunochromatographie dans les fèces de veau. La réalisation et la lecture de ces tests se font en 15 minutes. Ces tests sont qualitatifs.

Pour la détection de l'ookyste de *C. parvum*, le test a une sensibilité de 0,947 et une spécificité de 0,95. (ANONYME 2005b)

L'utilisation de ce test chez le chevreau n'a pas été validée en laboratoire mais certains praticiens l'utilisent déjà en routine dans cette espèce car il est simple, rapide et peu onéreux. Une limite à l'utilisation de ce test qualitatif pourrait éventuellement être reliée à sa grande sensibilité puisqu'il n'est pas rare que des chevreaux sains excrètent pourtant une certaine quantité d'ookystes.

2. Diagnostic nécropsique

Aucun élément majeur n'est à signaler au plan macroscopique.

Les lésions sont :

- ▶ cachexie et amyotrophie
- ▶ distension du caecum et du colon
- ▶ contenu intestinal plus au moins liquide, blanc, jaunâtre à brunâtre
- ▶ possible congestion du dernier tiers de l'iléon et hypertrophie des nœuds lymphatiques mésentériques

(CHARTIER 2002, CHAMBON 1994)

L'examen histologique de la partie terminale de l'intestin grêle révèle par contre une atrophie et une fusion des villosités, la dégénérescence et l'abrasion des microvillosités, une infiltration par diverses cellules inflammatoires et surtout la visualisation des parasites au sein de la bordure en brosse. (CHARTIER 2002a, RADOSTIS *et al.* 2000)

La visualisation de ces lésions suppose que les tissus aient été fixés dans du formol immédiatement après la mort, elle est plus inconstante lors d'autolyse. (SMITH et SHERMAN 1994)

Les méthodes utilisées pour rechercher les ookystes dans les fèces restent applicables sur l'animal mort.

F. Traitement et prévention

1. Traitement symptomatique

Un traitement symptomatique de la diarrhée peut être entrepris mais il n'est pas habituel en élevage caprin compte tenu du grand nombre de chevreaux et de leur faible valeur économique.

Il consisterait à :

a) Réhydrater

L'apport d'eau et d'électrolytes peut se faire *per os* ou par voie parentérale pour les animaux de haute valeur économique (cela concerne donc surtout des veaux). Il est important de lutter contre l'hypoglycémie car les réhydratants oraux classiques ne sont pas assez énergétiques et ne donnent pas de bons résultats chez les chevreaux.

b) Lutter contre la maldigestion

Certains auteurs conseillent l'arrêt de l'allaitement et le recours à un aliment de remplacement. (CHARTIER 2001 b)

D'autres suggèrent de conserver le lait mais de fractionner les repas afin de faciliter sa digestion.

La quantité de lait doit être identique à celle recommandée pour un animal sain du même âge afin de minimiser les baisses de croissance. (RADOSTIS *et al.* 2000)

c) Protéger la muqueuse intestinale

L'utilisation de topiques intestinaux peut être recommandée.

La smectite (SMECTIVET ND) contribue à la protection de la muqueuse intestinale grâce à son pouvoir couvrant. Elle se lie aux glycoprotéines du mucus, rendu ainsi plus résistant.

La smectite possède aussi des propriétés adsorbantes et absorbantes.

Le kaolin est intéressant également pour son pouvoir adsorbant des acides organiques issus de la maldigestion, il réduit ainsi la diarrhée osmotique.

La pectine protège la muqueuse intestinale et ralentit le transit digestif, elle limite la maldigestion. (KAOPECTATE ND kaolin et pectine)

Le charbon activé possède un fort pouvoir adsorbant, il est parfois conseillé. (CHAMBON 1990)

Ces produits sont des traitements adjuvants. Leur efficacité n'est pas toujours reconnue.

Ces soins doivent être dispensés tous les jours et sur plusieurs jours.

Ces traitements symptomatiques ne peuvent pas être raisonnablement recommandés en élevage caprin.

d) Prévenir les surinfections

Certains auteurs préconisent de ne recourir aux antibiotiques qu'en cas de co-infections avérées par des bactéries. Les antibiotiques agissent en effet sur la flore intestinale normale ce qui peut réduire la résistance aux cryptosporidies. (DUBEY *et al.* 1990)

2. Contrôle hygiénique

En l'absence de molécule totalement efficace, les mesures d'hygiène sont essentielles pour minimiser le risque d'apparition de la cryptosporidiose en élevage.

Il s'agit de réduire le nombre d'ookystes présents dans l'environnement des chevreux dès les premières naissances et de maintenir cette contamination à son plus faible niveau :

Entre chaque bande, il est recommandé de retirer la litière, de curer les locaux d'assurer ensuite un nettoyage à chaud, à haute pression puis de réaliser un vide sanitaire.

Le nettoyage et la désinfection quotidienne du matériel à l'aide de produits actifs contre les ookystes (ammoniaque entre 5 et 50 %, formol 10 %) permettent de réduire la contamination de l'environnement et l'incidence de la maladie.

Pour une bande de chevreaux, le parc doit être maintenu très propre et sec, au moins pendant les deux à trois premières semaines de vie : cette précaution retarde l'exposition des animaux aux ookystes. Passé cet âge, les chevreaux sont moins sensibles.

Les chevreaux doivent être séparés en lots en fonction de leur âge afin d'éviter de mélanger les plus jeunes avec des chevreaux plus âgés, excréteurs mais moins sensibles.

Les malades doivent impérativement être séparés des animaux sains, le matériel utilisé à leur contact doit être nettoyé et désinfecté systématiquement.

La population de mouches doit être maîtrisée.

(DUBEY *et al.* 1990, HARP et GOFF 1998, CHARTIER 2002a, MOORE *et al.* 2003)

3.Arsenal thérapeutique

a)Molécules

Plus de 140 molécules ont été testées contre *C. parvum* mais aucune n'a donné de résultats entièrement satisfaisants.

Chez les ruminants domestiques, deux molécules seulement ont donné des résultats significatifs en conditions expérimentales et naturelles : le lactate d'halofuginone et la paromomycine. Elles sont utilisées sur le terrain. Elles ne permettent pas un contrôle total du parasite. (CHARTIER 2002a)

Le décoquinate et le lasalocide sont deux molécules coccidiostatiques, parfois utilisées empiriquement sur le terrain pour traiter la cryptosporidiose. Elles ont montré une certaine efficacité au cours d'essais en conditions expérimentales. Cette efficacité reste controversée. (CHARTIER 2002a)

La α -cyclodextrine et la β -cyclodextrine ont récemment donné des résultats prometteurs au cours d'essais expérimentaux *in vitro* et *in vivo*. (CASTRO-HERMIDA *et al.* 2000a, CASTRO-HERMIDA *et al.* 2001a, CASTRO-HERMIDA *et al.* 2001b, CASTRO-HERMIDA et ARES-MAZAS 2003, CASTRO-HERMIDA *et al.* 2004)

Des pistes vaccinales (protection des nouveau-nés *via* l'immunisation des mères) sont en cours d'exploration mais aucun résultat concret n'est disponible à l'heure actuelle. (CHARTIER 2001b, CHARTIER 2002a, GUILLET 2005)

Les molécules précédemment citées feront donc l'objet de paragraphes détaillés.

D'autres molécules importantes, considérées comme prometteuses au cours des premiers essais les concernant, seront présentées plus succinctement.

La nitazoxanide est utilisée en milieu hospitalier pour traiter la cryptosporidiose des sidéens en particulier. Elle commence à être préférée au traitement usuel à base de paromomycine (HUMATIN ND). Les deux molécules ont une efficacité assez comparable chez les hommes, mais la nitazoxanide est jugée moins toxique que la paromomycine. (ROASEAU 2003)
C'est une molécule qui pourrait aussi avoir un avenir chez les ruminants si les avantages qu'elle présente pour l'homme se retrouvent dans ces espèces.

(1) Le lactate d'halofuginone

L'halofuginone est un produit de synthèse dérivé de la fébrifugine (isolée d'une plante asiatique : *Dichroa febrifuga*). Il appartient au groupe chimique des quinazolinones. (HOECHST ROUSSEL VET 2000, CHAMBON 1990)

Il existe deux sels de cette molécule :

- ▶ Le bromhydrate d'halofuginone, poudre blanche grisâtre, insoluble dans l'eau, est utilisé comme additif anticoccidien (STENOROL ND) pour les poulets, les poulettes destinées à la ponte et les dindons. Il n'est pas actif contre *C. parvum*. (CHAMBON 1990, Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2003)
- ▶ Le lactate d'halofuginone est une poudre beige, soluble dans l'eau. Ce sel a montré une certaine efficacité contre *C. parvum*.

(a) Propriétés pharmacologiques et mécanismes d'action

Les propriétés pharmacologiques du lactate d'halofuginone ont été étudiées chez le veau.

Après administration orale, le lactate d'halofuginone est absorbé.

La concentration plasmatique maximale est atteinte 11 heures après l'ingestion.

L'halofuginone inchangé est le principal composant dans les tissus.

Il est principalement excrété dans l'urine.

La demi-vie d'élimination terminale est de 30,84 heures après une seule administration orale.

Le mécanisme d'action du lactate d'halofuginone est mal connu. Il a une action cryptosporidiostatique et agit que les stades asexués soit pendant les 2 premiers jours du cycle. (HOECHST ROUSSEL VET 2000)

(b)Essais thérapeutiques

(i)Premiers résultats

Cette molécule a d'abord été testée en 1989 chez des agneaux infectés expérimentalement par *C. parvum*. (NACIRI et YVORE 1989)

L'halofuginone était d'ores et déjà connu pour ses propriétés anticoccidiennes (sous forme de bromhydrate) et était utilisé pour le traitement de la theilériose bovine (sous forme de lactate) en Afrique (TERIT ND) lors de cet essai. (CHAMBON 1990)

Tous les agneaux de l'essai ont été inoculés à l'âge de un jour (J0). Les traitements ont débuté deux jours plus tard (donc avant l'apparition des symptômes) et ont été maintenus 3 jours ou 5 jours selon le lot.

Les animaux ont reçu 0,5 mg de lactate d'halofuginone par kg de poids vif et par jour en dilution dans de l'eau, *per os*.

Ces administrations répétées ont considérablement réduit l'excrétion d'ookystes, qui a même été nulle dans le lot traité 5 jours. Les deux lots traités n'ont pas eu de diarrhées. Leur gain de poids a été significativement plus élevé dans les lots traités par rapport au lot témoin entre J4 et J8 ($p < 0,05$).

La réduction d'appétit a été le seul effet secondaire remarquable. Plus le traitement était long, plus elle était marquée.

Ces premiers résultats ont encouragé à évaluer l'efficacité du lactate d'halofuginone chez des espèces plus sensibles à *C. parvum*, veaux et chevreaux, dans lesquelles le bénéfice clinique et économique pourrait s'avérer supérieur.

(ii)Essais chez le veau

Chez des veaux de 3 à 6 jours infectés naturellement par *C. parvum*, l'administration de 0,5 mg/kg/jour de lactate d'halofuginone pendant 3 jours consécutifs ou 3 fois à 3 jours d'intervalle, s'est soldée par l'apparition d'anorexie, dépression et/ou diarrhées liquides liées au traitement, dans les 24 h suivant le début du traitement. (VILLACORTA *et al.* 1991)

Ces veaux ont développé ensuite une croissance compensatrice dont le résultat n'a été que

partiel puisque 28 jours après, leur gain de poids restait significativement réduit par rapport à un lot témoin. ($p < 0,05$)

Ce traitement a pourtant été efficace : il a permis la disparition de l'excrétion d'ookystes et des diarrhées, 5 jours après son initiation ($p < 0,001$). Néanmoins les signes de toxicité observés devaient inciter à tester des doses plus faibles.

Par ailleurs, 9 à 10 jours après l'arrêt du traitement, l'excrétion d'ookystes a momentanément repris chez de nombreux veaux traités et certains d'entre eux ont présenté de nouvelles diarrhées liquides.

Les veaux traités sur la période la plus longue (3 fois à 3 jours d'intervalle, au lieu de 3 jours consécutifs) ont été moins concernés par cet effet rebond. ($p < 0,05$)

Les auteurs ont suspecté une mauvaise installation de l'immunité vis-à-vis du parasite, suite au traitement. Les animaux se sont réinfectés dès la fin du traitement. Cette immunité semble d'autant plus défaillante que le traitement cesse tôt.

Le traitement a donc été réitéré avec des doses moindres et administrées 7 jours consécutifs : 0,250 ; 0,125 et 0,060 mg/kg/jour.

Cinq à six jours après la première administration de lactate d'halofuginone, 98 % de l'ensemble de ces veaux n'excrétaient plus d'ookystes et n'avaient plus de diarrhées. ($p < 0,001$)

Aucun signe de toxicité n'a été observé pour de telles doses.

Sept à dix jours après l'arrêt du traitement, l'excrétion a repris chez certains animaux, sur une période de deux semaines maximum. Le nombre d'animaux concernés, les diarrhées et l'excrétion d'ookystes étaient d'autant plus faibles que la posologie de lactate d'halofuginone utilisée avait été basse.

Les auteurs ont alors tenté de traiter avec 0,030 mg/kg/jour pendant 15 jours. L'excrétion d'ookystes a stoppé chez tous les veaux mais elle a repris au cours du traitement. L'effet rebond a été très limité dans ce cas mais les auteurs ont estimé que cette posologie n'inhibait pas suffisamment la multiplication du parasite.

L'utilisation de doses comprises entre 0,06 et 0,100 mg par kg et par jour pendant 7 jours consécutifs est apparue comme un bon compromis permettant un contrôle correct de la maladie et une certaine installation de l'immunité. (VILLACORTA *et al.* 1991)

Des études ultérieures ont confirmé l'intérêt de telles posologies chez le veau, de même pour la durée du traitement. (NACIRI *et al.* 1999, LEFAY *et al.* 2001).

Ces deux derniers essais ont aussi précisé l'action du lactate d'halofuginone et les limites de son efficacité.

Les deux essais ont été réalisés sur des veaux infectés naturellement.

Le lactate d'halofuginone a été administré 7 jours durant, à raison de 0,120 mg par kg et par jour, *per os*, dans ces deux études.

NACIRI *et al.* (1999) ont mesuré l'efficacité du produit sur des veaux diarrhéiques âgés de 4 à 10 jours. C'est donc l'action curative du traitement qui a été évaluée dans un premier temps.

Les mêmes auteurs ont répété l'essai sur un deuxième lot de veaux âgés de 24 à 48 heures afin de juger des propriétés préventives du lactate d'halofuginone. Chez des animaux si jeunes, le cycle parasitaire ne s'est pas encore terminé et la diarrhée est absente.

LEFAY *et al.* (2001) ont également travaillé dans cette optique de chimioprophylaxie : les veaux qu'ils ont utilisés avaient entre 6 et 48 heures.

Effet sur l'excrétion fécale d'ookystes :

Les auteurs ont réalisé un suivi de l'excrétion fécale d'ookystes dans le groupe placebo (témoin) et dans le groupe traité.

L'examen microscopique des fèces a permis d'attribuer un score à chacun des animaux. Ce score était compris entre 0 (absence d'ookystes observés) et 5 (plus de 20 ookystes par champ, à l'objectif x 25).

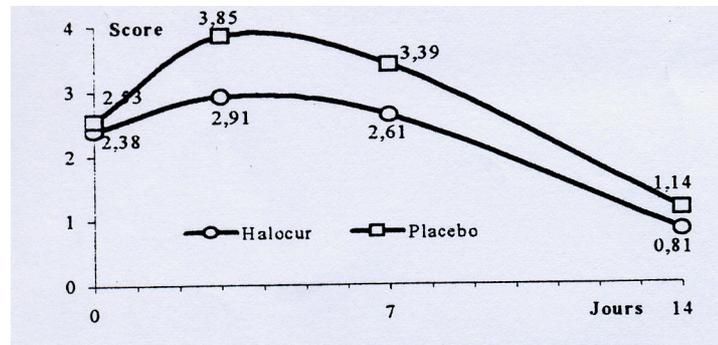
Les moyennes quotidiennes des scores du lot traité ont été comparées à celles du lot témoin.

Résultats obtenus lors du traitement curatif :

Comme on l'observe sur la figure 1 ci-dessous, le traitement a permis une diminution de l'excrétion d'ookystes. Cette diminution est significative ($p= 0,0005$).

Toutefois, l'excrétion fécale d'ookystes *demeure élevée* chez les veaux traités. (Score moyen de 2,61 chez les veaux traités après 7 jours de traitement)

Figure 1 : Courbes d'évolution des excréments moyennes d'ookystes (score 0 : absence d'ookystes observés, à 5 : plus de 20 ookystes par champ, à l'objectif x 25) du lot témoin et du lot traité en curatif avec le lactate d'halofuginone (HALOCUR ND), de l'essai de NACIRI *et al.* (1999)



(NACIRI *et al.* 1999)

Résultats obtenus lors du traitement préventif :

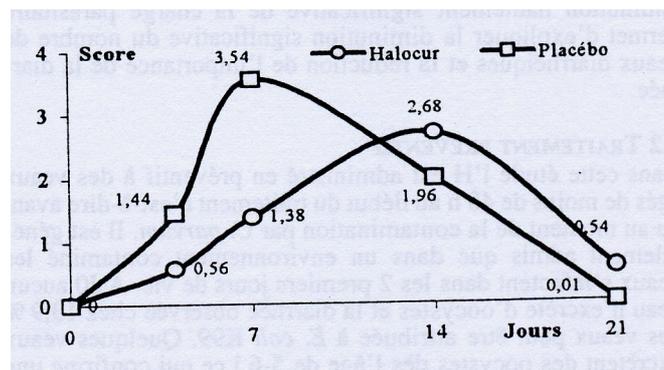
Sur l'ensemble de la période d'observation, l'excrétion a été significativement réduite chez les veaux traités ($p= 0,0001$), de même pour le nombre de veaux excréteurs.

Huit jours après l'arrêt du traitement, l'excrétion d'ookystes dans le lot traité a atteint son maximum (score 2,68) et a dépassé celle du lot témoin (1,96). (Figure 2)

Le pic d'excrétion dans le lot traité est retardé par rapport à celui du lot témoin. Cette observation rejoint celle de VILLACORTA *et al.* (1991).

Les résultats obtenus par LEFAY *et al.* (2001) sont similaires.

Figure 2 : Courbes d'évolution dans le temps des excréctions moyennes d'ookystes (score 0 : absence d'ookystes observés, à 5 : plus de 20 ookystes par champ, à l'objectif x 25) du lot témoin et du lot traité préventivement avec le lactate d'halofuginone (HALOCUR ND), de l'essai de NACIRI *et al.* (1999)



(NACIRI *et al.* 1999)

Effets sur la diarrhée :

L'aspect des fèces a été noté : score 0, normal ; score 1 diarrhée semi-liquide ; score 2,

diarrhée liquide.

Résultats obtenus lors du traitement curatif :

Le traitement a provoqué une diminution significative du nombre de veaux diarrhéiques.

Après 3 jours de traitement (à J3), 51 % des veaux avaient la diarrhée dans le lot traité contre 63,4 % dans le lot témoin. A partir de J3, ce nombre de diarrhéiques n'a augmenté que de 3 % chez les traités contre 31 % chez les témoins.

Le traitement a également permis une réduction de la sévérité de la diarrhée ($p=0,02$). 18 % des veaux traités avaient une diarrhée liquide à J3 contre 31 % chez les témoins.

Résultats obtenus lors du traitement préventif :

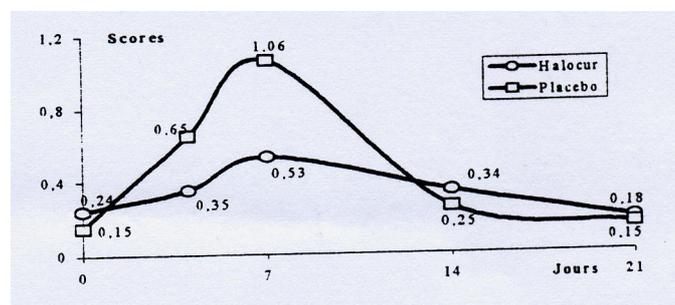
Le lactate d'halofuginone a réduit la diarrhée de façon très significative ($P=0,0001$) mais il ne l'a pas empêchée totalement comme on l'observe sur la figure 3 ci-dessous.

L'évolution des scores fécaux dans les deux lots est superposable.

Il est important de noter que l'effet rebond observé dans l'excrétion du lot traité à J14 a été sans incidence clinique, il n'est pas associé à un pic de diarrhées retardé.

Les résultats obtenus par LEFAY *et al.* (2001), sont similaires.

Figure 3 : Courbes d'évolution dans le temps des scores fécaux moyens (score 0 : selles normales, score 1 : diarrhée semi-liquide, score 2 : diarrhée liquide) du lot témoin et du lot traité préventivement avec le lactate d'halofuginone (HALOCUR ND), de l'essai de NACIRI *et al.* (1999)



(NACIRI *et al.* 1999)

Conclusion :

Le lactate d'halofuginone s'est avéré *partiellement* efficace dans le traitement et surtout la prévention de la cryptosporidiose chez le veau.

Le traitement doit débuter au cours des 48 premières heures de vie, il permet alors la réduction significative du nombre de veaux excréteurs, du nombre d'ookystes excrétés et de la diarrhée.

Le lactate d'halofuginone agit sur les stades précoces du parasite et est cryptosporidiostatique : les parasites ne sont pas complètement éliminés mais leur développement est retardé. (VILLACORTA 1991, CHARTIER 2001b, HOECHST ROUSSEL VET 2000)

Cela explique à la fois la supériorité du traitement préventif par rapport au traitement curatif, et le décalage du pic d'excrétion d'ookystes dans les lots traités. Ce retard dans le développement du parasite, permet l'installation d'une immunité efficace avec pour conséquence la réduction de l'excrétion d'ookystes, de la fréquence et de la sévérité des diarrhées et du taux de mortalité. (CHARTIER 2001b, HOECHST ROUSSEL VET 2000)

Si le traitement est trop court ou trop puissant, l'immunité acquise n'est pas suffisante et l'excrétion post-traitement est plus marquée. Elle résulte soit d'une ré-infection, soit de la ré-activation du parasite jusque là inhibé par le traitement. (LEFAY *et al.* 2001)

(iii)Essais chez le chevreau

Comme chez l'agneau puis le veau, les premiers traitements à la posologie de 500 µg/kg/jour ont montré une certaine efficacité mais aussi une toxicité évidente : fatigue, intensification des diarrhées, arrêt de la croissance ou amaigrissement chez les chevreaux traités. (CHAMBON 1990)

Des essais ultérieurs, à des posologies moindres, ont été conduits.

L'essai de CHARTIER *et al.* (1999), a porté sur des chevreaux de 3 jours en conditions

naturelles. C'est l'efficacité préventive qui a donc été mesurée.

Dans le lot d'animaux traités, à raison de 0,1 mg par kg et par jour pendant 7 jours, la prévalence et l'intensité de l'excrétion ont été réduites.

Chez les témoins, l'excrétion a débuté à l'âge de 5-6 jours. Elle est devenue très importante (plus de 30 ookystes par champ en moyenne, au grossissement 100, entre 7 et 9 jours) et a concerné 100 % des animaux âgés de 7 à 12 jours. Chez les survivants l'excrétion a ensuite diminué, pour devenir indétectable à 21 jours.

Chez les chevreaux traités, l'excrétion a débuté à l'âge de 6 jours, elle n'a concerné que 51 à 73 % des animaux entre 7 et 15 jours et elle a été moins intense. (15 ookystes par champ en moyenne entre 7 et 9 jours)

L'arrêt du traitement a été suivi d'une nouvelle phase d'excrétion d'ookystes entre J13 et J21. Des animaux sont morts au cours de cette rechute contrairement à ce qui avait été observé chez le veau. Le taux de mortalité global à 27 jours a été ramené à 35 % chez les traités contre 62 % chez les témoins.

Les auteurs ont conclu à une efficacité préventive partielle du lactate d'halofuginone chez le chevreau à cette posologie.

Ils ont ajouté que des études complémentaires portant sur la posologie et la durée du traitement étaient nécessaires. Un traitement plus long (9 à 12 jours) pourrait permettre de réduire l'excrétion post-traitement et ses conséquences.

(c) Toxicité

Comme le suggéraient les résultats obtenus par VILLACORTA *et al.* (1991), le lactate d'halofuginone est assez vite toxique. Aucun effet secondaire n'est observé à la dose thérapeutique chez le veau (0,1 mg/kg/jour, 7 jours). A deux fois cette dose, quelques signes transitoires et légers sont observés. Dès trois fois la dose thérapeutique, apparaissent des diarrhées, des pertes de poids, des cas de lymphopénies et quelques cas de mortalité. (HOECHST ROUSSEL VET 2000)

La présence de sang visible dans les fèces, la diminution de la consommation de lait, l'apathie et la prostration sont d'autres signes possibles de toxicité. (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2003)

La DL 50 est de 30 mg/kg chez le rat et 5 mg/kg chez la souris. (HOECHST ROUSSEL VET 2000)

(d) Utilisation de la molécule sur le terrain:

(i) Chez le veau

Les précédents essais ont conduit à la mise sur le marché du lactate d'halofuginone. (HALOCUR ND) Le médicament dispose d'une AMM pour l'indication « cryptosporidiose chez le veau ». (AMM européenne du 29/10/99) (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2003)

Les modalités d'utilisation sont les suivantes :

- ▶ Administration *per os*, après le repas
- ▶ 0,1 mg par kg de poids vif et par jour pendant 7 jours, la dose doit être précisément ajustée au poids
- ▶ Traitement préventif à commencer dans les 48 premières heures de vie sur tous les veaux nouveau-nés à partir du moment où le diagnostic de cryptosporidiose a été établi sur un veau
- ▶ Traitement curatif (réduction de la diarrhée) à instaurer dans les 24 heures suivant l'apparition de la diarrhée, il n'est plus efficace passé ce délai
- ▶ Temps d'attente de 13 jours pour la viande et les abats

(ANONYME 2001, Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2003)

(ii) Chez le chevreau

HALOCUR ND n'a pas d'autorisation de mise sur le marché pour les caprins mais il peut être utilisé légalement par le biais de la cascade. (Article L.5143-4 du Code de la Santé Publique)

Le principe de la cascade est défini au niveau communautaire dans la directive européenne n° 2001/82/CE du 6 novembre 2001.

Chez le chevreau il est recommandé d'administrer le lactate d'halofuginone préventivement à raison de 0,1 mg/kg/jour, en une prise, *per os*, pendant 10-12 jours, à partir du troisième jour

de vie. (CHARTIER 2001b)

Après confirmation d'un cas de cryptosporidiose, tous les prochains chevreaux à naître doivent être ainsi traités. (CHARTIER *et al.* 1999)

Etant donné le profil toxicologique de la molécule, les chevreaux traités doivent être pesés régulièrement au cours du traitement afin d'ajuster la dose de lactate d'halofuginone à leur poids. (HOECHST ROUSSEL VET 2000, CHARTIER *et al.* 1999)

La mise en place de ce traitement peut s'avérer contraignante puisque les chevreaux concernés sont souvent très nombreux.

Puisque cette utilisation de HALOCUR ND fait appel à la cascade, le temps d'attente fixé par le vétérinaire sur sa prescription ne peut pas être inférieur aux temps d'attente forfaitaires fixés par l'arrêté ministériel du 16 octobre 2002, à savoir 28 jours pour la viande. Le temps d'attente forfaitaire fixé par le vétérinaire sera toujours \geq 28 jours après l'arrêt du traitement. (Article L.5143-4 du Code de la Santé Publique)

Le respect de ce temps d'attente est une sérieuse limite à l'utilisation de l'HALOCUR ND chez les chevreaux de boucherie abattus autour d'un mois d'âge. Dans ce contexte HALOCUR ND doit être réservé aux animaux de renouvellement.

Le **lactate d'halofuginone** est la seule molécule qui possède une autorisation de mise sur le marché, pour l'indication « cryptosporidiose chez le veau » (HALOCUR ND, AMM européenne du 29/10/99) (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2003).

Elle n'a pas d'autorisation de mise sur le marché pour les caprins mais peut être utilisée légalement par le biais de la cascade.

Elle est partiellement efficace pour prévenir la cryptosporidiose. Son efficacité curative est nulle si la maladie évolue depuis plus de 24 heures, avant ce délai, une réduction de la diarrhée peut être espérée.

La marge d'utilisation thérapeutique du lactate d'halofuginone est étroite. La dose recommandée est de 0,1 mg/kg/jour chez le chevreau.

La durée du traitement doit être respectée – 10 à 12 jours chez le chevreau- car un effet rebond est à craindre si le traitement cesse trop tôt. Cet effet rebond peut entraîner la mort de chevreaux.

La réalisation du traitement peut être contraignante pour l'éleveur, de même que l'application de la réglementation relative à la cascade chez le chevreau. (Temps d'attente \geq 28 jours)

(2)La paromomycine

La paromomycine est un antibiotique de la famille des aminosides.

Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans l'eau. (FAYER *et al.* 1993)

Elle possède un large spectre antibactérien, proche de celui de la néomycine.

Elle est active également contre plusieurs protozoaires parasites du tube digestif tels *Entamoeba histolytica* ou *Giardia intestinalis* et contre les leishmanies. (CLEZY *et al.* 1991, MARSHALL et FLANIGAN 1992, MANCASSOLA *et al.* 1994)

(a)Propriétés pharmacologiques et mécanismes d'action

La paromomycine administrée oralement est très faiblement absorbée. Plus de 99 % d'une dose administrée *per os*, reste dans la lumière intestinale. (MARSHALL et FLANIGAN 1992) Elle est éliminée sans modification dans les fèces. (Dictionnaire VIDAL 1991-consultation d'une édition ancienne du VIDAL car la spécialité à base de paromomycine, HUMAGEL ND, a été retirée en 1995-)

La paromomycine est donc rapidement et massivement présente sur le site de l'infection par *C. parvum*. Elle a une action locale.

Elle pourrait tenir son activité anti-cryptosporidienne de son aptitude à inhiber l'activité de ribosomes impliqués dans la synthèse de protéines, très amplifiée au cours de la multiplication du parasite. Cette hypothèse repose sur les données relatives au mode d'action d'autres aminoglycosides. (MARSHALL et FLANIGAN 1992, HAMMEL *et al.* 1992)

(b)Essais thérapeutiques et toxicité

Le sulfate de paromomycine a un spectre d'activité qui inclut de nombreuses bactéries gram-, les amibes et *Giardia*. Il a été commercialisé en médecine humaine dès le milieu des années 1960 (HUMAGEL ND) (CHARTIER 2001b). Ce médicament était indiqué dans le traitement des diarrhées aiguës présumées infectieuses chez l'enfant. (Dictionnaire VIDAL

1991)

A la fin des années 1980 le SIDA devient une des premières préoccupations des médecins : les cas sont de plus en plus nombreux.

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine se complique de diarrhées chez 60 % des patients dans les pays développés et jusqu'à 90 % dans les pays en voie de développement.

La cryptosporidiose est l'infection digestive la plus fréquente chez le sujet séropositif pour le V.I.H. (VERDON et RENE, 1993)

Aux Etats-Unis, 5 % des malades du SIDA présentent une cryptosporidiose. Cette affection touche aussi 30 % des sidéens en Afrique et à Haïti. (MARSHALL et FLANIGAN, 1992)

Elle se traduit par des diarrhées sévères, fréquentes, persistantes ; une perte de poids marquée ; une déshydratation importante. Moins souvent, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et parfois un syndrome fébrile, sont observés. Chez ces patients, *C. parvum* peut coloniser les voies biliaires et pancréatiques ainsi que le tractus respiratoire, en plus de sa localisation intestinale habituelle.

C'est une affection susceptible de menacer le pronostic vital des patients. (FICHTENBAUM *et al.* 1992, HAMMEL *et al.* 1992, VERDON et RENE 1993, FAYER 2004). Elle serait la cause de 10 % des morts chez les sidéens. (JENKINS *et al.* 1998)

Les humains victimes d'autres causes d'immunodépression (malnutrition, cancers, etc.) sont eux aussi menacés par une cryptosporidiose persistante. (Chez l'homme immunocompétent l'infection se résout habituellement en 2 à 26 jours ; moyenne 12 jours.) (FAYER 2004)

Aucune molécule n'étant vraiment efficace pour soigner la cryptosporidiose, les essais se multiplient.

L'activité du sulfate de paromomycine vis-à-vis des cryptosporidies a d'abord été documentée chez l'homme, à partir de 1991. (CLEZY *et al.* 1991, CHARTIER 2001b)

Les premiers résultats (empiriques) obtenus chez des sidéens ont été prometteurs.

(i) Essai *in vitro*

La paromomycine s'est révélée très efficace contre *C. parvum in vitro*. (MARSHALL et FLANIGAN 1992)

Dans cet essai, des clones différenciés d'entérocytes humains (HT29.74) ont été exposés à

des ookystes préalablement incubés dans du PBS seul (témoin) ou additionné de paromomycine à différentes concentrations.

Dès 50 µg/ml, la paromomycine ajoutée a permis de réduire significativement l'infection des cellules (estimée par comptage des mérozoïtes) ($p < 0,05$ pour 50 µg/mL, $p < 0,001$ pour 500 et 5000 µg/ml). Cette activité était dose dépendante et pour 5000 µg/ml de paromomycine, l'infection des cellules a été réduite de 86 % par rapport au témoin.

La paromomycine, à ces concentrations, n'a pas été toxique pour les cellules HT29.74.

(ii) Résultats chez l'homme immunodéprimé

Les résultats obtenus sont variables.

Des patients ont reçu des doses comprises entre 1,5 et 2 g de paromomycine par jour, sur une durée de quelques semaines.

Une réponse au traitement a généralement été notée chez tous ces patients : l'excrétion fécale d'ookystes a été réduite, les diarrhées étaient moins fréquentes et moins profuses, le poids corporel s'est stabilisé. Certains malades ont, semble-t-il, éliminé totalement le parasite. (CLEZY *et al.* 1991, ARMITAGE *et al.* 1992, FICHTENBAUM *et al.* 1992, GOODGAME *et al.* 1993)

Des rechutes pendant ou peu après le traitement ont néanmoins été décrites dans chacun des précédents essais.

FICHTENBAUM *et al.* (1992) ont aussi évoqué le cas d'un patient qui n'a jamais répondu au traitement.

La paromomycine semble avoir une efficacité marquée contre *C. parvum in vivo*, bien que les résultats des précédents essais ne soient pas toujours simples à interpréter compte tenu de la faiblesse des patients, souvent incapables de s'immuniser contre le parasite et donc susceptibles de se ré-infecter perpétuellement ou de contracter d'autres affections diarrhéiques qui modifient les résultats cliniques. (GOODGAME *et al.* 1992)

Les traitements ont été bien tolérés la plupart du temps.

Quelques cas de nausées ou douleurs abdominales ont été observés dès 1,5 à 2 g par jour mais les signes de toxicité (nausées, douleurs abdominales et diarrhées) n'apparaissent souvent que pour des doses de 3 g par jour et plus. (ARMITAGE *et al.* 1992, FICHTENBAUM *et al.* 1992)

Ces symptômes sont à relier avec une malabsorption par atrophie villositaire qui est un risque bien connu lors d'un traitement par des aminosides. (Dictionnaire VIDAL 1991)

La spécialité à base de sulfate de paromomycine disponible en France, HUMAGEL ND, a donc pu être utilisée pour traiter des cryptosporidioses.

Des effets indésirables supplémentaires sont mentionnés pour ce médicament : comme les autres aminosides, la paromomycine est potentiellement toxique pour l'oreille interne et les reins.

Ces actions toxiques sont peu probables lors d'administration *per os*, compte tenu du faible passage dans la circulation sanguine. Le risque persiste quand même, notamment en cas d'altération de la muqueuse digestive ou de traitement long.

Le traitement par HUMAGEL ND dans son indication chez l'enfant, est limité à 4 jours au maximum, à la dose de 50 mg/kg/jour de paromomycine. (Dictionnaire VIDAL 1991)

Ces données ne concernent pas la cryptosporidiose et les traitements instaurés chez les sidéens sont nettement plus forts : 1g de paromomycine 3 fois par jour pendant une durée indéterminée ; en pratique, le traitement est prolongé indéfiniment. (VERDON et RENE 1993)

HUMAGEL ND a été retiré en 1995 mais une spécialité étrangère équivalente, HUMATIN ND reste disponible en milieu hospitalier.

A la suite de ces résultats, la paromomycine a fait l'objet d'essais chez les jeunes ruminants.

(iii) Essais chez les jeunes ruminants

○ *Chez le veau*

FAYER et ELLIS (1993) ont évalué l'action de la paromomycine chez des veaux infectés expérimentalement par *C. parvum* à 7 jours d'âge. Les veaux ont reçu des doses de 100, 50 ou 25 mg/kg/jour pendant 11 jours. Ces traitements ont été initiés la veille de l'inoculation des veaux, soit préventivement.

Dans le lot traité à 100 mg/kg/jour, la sévérité et la durée de la diarrhée, le nombre d'ookystes excrétés par jour et la durée de l'excrétion d'ookystes, ont été significativement

réduits par rapport au lot témoin. ($p < 0,05$)

Les veaux traités à 100 mg/kg/jour n'ont en fait excrété aucun ookyste pendant toute la période de l'essai (28 jours). Des diarrhées peu sévères ont été observées dans ce lot et pourraient être induites par le traitement.

Seule la sévérité de la diarrhée a été significativement diminuée dans les lots à 50 et 25 mg/kg/jour, par rapport au témoin. Tous les veaux du lot à 50 mg/kg/jour et la moitié des veaux du lot à 25 mg/kg/jour ont excrété des ookystes. Pour deux tiers de ces veaux, l'excrétion a débuté 2 à 10 jours après l'arrêt du traitement ; elle a débuté en seconde moitié de la période de traitement pour le tiers restant.

Tous les veaux témoins ont excrété des ookystes dès 4 ou 5 jours après l'inoculation.

Ces observations laissent penser que la dose 100 mg/kg/jour a tué tous les ookystes, tandis que les doses plus faibles n'ont fait que retarder leur développement ou n'en ont tué qu'une partie.

Dans cet essai, l'administration de 100 mg/kg/jour a été efficace bien que l'installation d'une immunité efficace contre *C. parvum* suite à ce traitement ne soit pas garantie.

L'essai de GRINBERG *et al.* en 2002 a eu pour but de tester la paromomycine sur des veaux infectés naturellement par *C. parvum*.

Dix veaux ont été traités préventivement, dès leur premier ou deuxième jour de vie, avec 100 mg/kg/jour de paromomycine, *per os*, pendant 10 jours.

Aucun veau traité n'a eu de diarrhée et un seul de ces 10 veaux a excrété des ookystes, en faible nombre, au cours du traitement.

Par contre, tous ces veaux ont commencé à excréter des ookystes deux à 10 jours après l'arrêt du traitement. Six jours après la fin du traitement, des diarrhées sont apparues dans ce même lot, chez tous les veaux.

Dans le lot témoin, la cryptosporidiose a suivi un schéma classique, les diarrhées et l'excrétion d'ookystes ont régressé progressivement au cours de la troisième semaine de vie.

En fin de troisième semaine, les veaux du lot traité excrétaient donc plus d'ookystes et avaient des diarrhées plus sévères que les veaux du lot témoin. ($p < 0,01$)

Les auteurs ont suggéré que la paromomycine possédait une puissante activité anti-cryptosporidienne mais qui empêchait le développement d'une immunité efficace contre le parasite. En conditions naturelles, les veaux se contaminent en permanence et des réinfections surviennent dès l'arrêt du traitement.

Ce phénomène, comparable à celui observé lors de traitement par le lactate d'halofuginone, constitue une limite à l'efficacité de la paromomycine sur le terrain.

Des essais supplémentaires portant sur la posologie et la durée du traitement pourraient permettre de supprimer cet « effet rebond ».

- *Chez le chevreau*

MANCASSOLA *et al.* (1994) ont travaillé sur des chevreaux âgés de 48 à 96h, inoculés expérimentalement. Les chevreaux ont été traités le lendemain de l'inoculation (J1) avec 100 mg/kg/jour de paromomycine, *per os*, pendant des 10 jours. Les résultats sont tout aussi encourageants.

Un seul des 10 chevreaux traités a excrété des ookystes et pendant une journée seulement, au cours de la période d'étude (J1-J35). Au contraire, les 9 chevreaux du lot témoin ont tous excrété des ookystes, entre J4 et J12.

Les diarrhées ont été réduites significativement dans le lot traité.

La paromomycine, 100 mg/kg/jour, administrée préventivement, pendant 10 jours, a prévenu l'infection chez ces chevreaux inoculés expérimentalement.

JOHNSON *et al.* (2000) ont évalué l'efficacité préventive de la paromomycine au cours d'un important épisode de cryptosporidiose dans un élevage caprin.

La paromomycine a été administrée oralement à raison de 100 mg/kg/jour, pendant 21 jours, dès la naissance des chevreaux.

Aucun des chevreaux traités n'a excrété d'ookystes au cours de la période d'observation (22 jours à partir de la naissance) et aucun symptôme caractéristique de la cryptosporidiose n'a été observé.

Au contraire, tous les animaux du lot témoin ont eu des diarrhées à *C. parvum* et certains en sont morts : cette conclusion s'est basée sur l'observation d'une excrétion massive d'ookystes pendant la même période. Aucun autre agent entéropathogène compatible avec l'âge des chevreaux n'a été retrouvé.

L'efficacité de la paromomycine à 100 mg/kg/jour pour prévenir la cryptosporidiose chez le chevreau a donc été confirmée sur le terrain.

Le traitement instauré dans cet essai était long (3 semaines) et aucun « effet rebond » n'a été signalé bien que les chevreaux aient été gardés 3 mois pour constater l'absence de toxicité à long terme de la paromomycine.

Cet essai confirme celui de CHARTIER *et al.* (1996) pour ce qui est de la posologie efficace chez le cheveau :

Les chevreaux ont été traités dès l'âge de 2 jours, pendant 11 jours. Ce traitement, moins long, a réduit significativement l'excrétion d'ookystes. Elle n'a pas été tout à fait absente comme dans l'essai de JOHNSON *et al.* (2000) mais le traitement a suffi à diminuer la sévérité des diarrhées et à limiter considérablement la mortalité. Le lot traité a eu par ailleurs un gain de poids moyen supérieur au lot témoin même si la différence n'était pas significative.

Compte tenu du coût d'un traitement à base de paromomycine, c'est cette durée plus courte qui est recommandée en pratique. Aucun signe de toxicité n'a été observé au cours de cet essai.

Les essais réalisés sur chevreaux en conditions naturelles n'ont pas montré d'« effet rebond » à l'arrêt du traitement tel qu'il avait été observé chez le veau par GRINBERG *et al.* (2002).

Ce phénomène pourrait dépendre de la qualité de l'environnement, plus ou moins propice à des réinfections massives à l'arrêt du traitement.

(iv) Toxicité chez les jeunes ruminants

Le sulfate de paromomycine *per os*, à la posologie préconisée, est peu toxique pour le jeune ruminant.

La tolérance est bonne lors d'administrations répétées puisque aucun effet secondaire n'est observé au cours des précédents essais sur les jeunes ruminants, mis à part quelques diarrhées chez le veau. (FAYER et ELLIS 1993)

La DL50 est très élevée : 15 000 mg/kg chez la souris *per os*. (CHARTIER *et al.* 1996)

(c) Utilisation sur le terrain

La paromomycine n'est pas disponible sur le marché français.

Des spécialités vétérinaires à base de sulfate de paromomycine sont disponibles en Belgique

(GABBROVET ND) et en Italie (GABBROCOL ND) seulement. Elles ne peuvent pas être légalement importées en France par un vétérinaire ou un éleveur. (GUILLET 2005)

La posologie efficace est de 100 mg/kg/jour pendant une dizaine de jour, *per os*.

Le traitement doit commencer au cours des deux premiers jours de vie. (CHARTIER 2001b)

C'est un traitement coûteux (\approx 5,30 euros par chevreau) et le délai d'attente pour l'abattage des chevreaux est de 30 jours en Belgique (LE GUILLOU 2002)

La paromomycine possède une assez bonne efficacité en préventif chez le chevreau.

La posologie efficace est de 100 mg/kg/jour pendant une dizaine de jours, *per os*.

Le traitement doit commencer au cours des deux premiers jours de vie. (CHARTIER 2001b)

D'autres essais ont mis en évidence une efficacité curative moindre. (GUILLET 2005)

Ce traitement est peu toxique.

La paromomycine est un traitement jugé des plus intéressant malgré son coût élevé, sa non disponibilité sur le marché français, et son temps d'attente de 30 jours en Belgique. Elle serait à réserver aux animaux de renouvellement.

(3) Le décoquinate

Le décoquinate est une molécule de synthèse coccidiostatique. (MOORE *et al.* 2003)

D'abord utilisé comme additif anticoccidien chez les volailles, le décoquinate a ensuite obtenu une AMM pour la prévention de la coccidiose chez les veaux et agneaux sevrés. (DECCOX ND, prémélange médicamenteux). Les doses efficaces sont les suivantes :

- ▶ Chez le veau, 0,5 mg/kg/jour pendant 4 à 5 semaines à partir de l'entrée en atelier d'engraissement
- ▶ Chez l'agneau, 1 mg/kg/jour pendant 9 semaines à partir de l'entrée en atelier d'engraissement (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2003)

Les propriétés anticoccidiennes du décoquinate sont connues depuis de nombreuses années. (MANCASSOLA *et al.* 1997)

(a) Propriétés pharmacologiques et mode d'action

L'absorption digestive du décoquinate est quasi nulle et son action est essentiellement locale. Le décoquinate agit sur les premiers stades parasites dans le cadre des coccidioses mais son action exacte n'est pas décrite. L'activité de cette molécule sur les cryptosporidies n'est pas mieux connue. (ANONYME 2005c)

(b) Essais thérapeutiques et utilisation sur le terrain

Comme pour de nombreux coccidiostatiques (lasalocide, halofuginone,...), une action anti-cryptosporidienne du décoquinate a été recherchée. Le décoquinate a d'abord été utilisé empiriquement par des vétérinaires. Les vétérinaires et les éleveurs concernés ont eu l'impression que le décoquinate réduisait les signes cliniques de la cryptosporidiose.

Les doses utilisées étaient supérieures à celles indiquées pour la prévention de la coccidiose et les traitements étaient suivis pendant les 4 premières semaines de vie. (MOORE *et al.* 2003)

Suite à ces observations, la molécule a fait l'objet d'essais aux conclusions controversées.

REDMAN et FOX (1994) ont travaillé sur des veaux infectés expérimentalement à l'âge de 4 jours par *C. parvum*.

Les veaux traités ont reçu 225 mg/jour de décoquinatate (10 fois la dose utilisée pour la coccidiose) pendant 8 semaines.

Ce traitement n'a pas empêché l'excrétion d'ookystes mais il a allongé le délai entre l'infection et le début de l'excrétion, réduit la durée de la période d'excrétion et amélioré la consistance des fèces par rapport à ce qui a été observé dans le lot témoin.

Les mêmes auteurs ont ensuite cherché à comparer l'efficacité de différents dosages de décoquinatate. Quatre lots ont été constitués : un lot témoin, un lot traité par 5 fois la dose utilisée pour la coccidiose (2,5 mg/kg/jour), deux autres lots traités par 10 et 20 fois cette même dose (5 et 10 mg/kg/jour). Ces traitements ont duré 4 semaines.

Dans les lots traités avec 2,5 et 5 mg/kg/jour, la durée de la période d'excrétion et le nombre moyen d'ookystes excrétés ont été diminués par rapport au lot témoin. De même pour le nombre de jours où la consistance des fèces était anormale. Le gain de poids moyen quotidien sur toute la période a été supérieur dans ces deux lots par rapport au témoin.

Ces résultats ont été plus marqués avec 5 mg/kg/jour par rapport à 2,5 mg/kg/jour.

Dans le lot traité par 5 mg/kg/jour il y a eu en plus un allongement du délai entre l'infection et le début de l'excrétion.

Ces différences n'étaient pas significatives (sauf le nombre de jours où la consistance des fèces était anormale) mais elles n'étaient pas loin de l'être.

Aucune différence n'a été observée entre le lot traité avec 10 mg/kg/jour et le lot témoin. Les auteurs n'ont pas pu expliquer cette dernière observation mais ont conclu que les résultats obtenus dans les 2 premiers lots traités étaient bénéfiques et devaient inciter à poursuivre les essais.

En 1997, MANCASSOLA *et al.* ont évalué l'efficacité du décoquinatate administré préventivement à des chevreaux infectés expérimentalement par *C. parvum*.

Deux lots ont été constitués : un lot témoin et un lot traité avec 2,5 mg/kg/jour de décoquinatate pendant 21 jours.

Tous les chevreaux ont été inoculés à l'âge de 5 ou 6 jours si bien que les symptômes de cryptosporidiose ont été modérés et aucun chevreau n'est mort.

Le traitement a quand même permis de réduire significativement le nombre d'ookystes excrétés ($p < 0,05$) et la durée de la période d'excrétion. Il a également prévenu l'apparition

des diarrhées.

Le traitement a été bien toléré. Des essais en conditions naturelles sont nécessaires pour valider ces résultats.

En 2000, LINDSAY *et al.* ont voulu vérifier les précédents résultats par des essais *in vitro* et sur souris nouveau-nés.

Des souris ont été traitées avec 2,5 mg/kg/jour ou 5 mg/kg/jour de décoquinate pendant 7 jours. Le traitement a commencé la veille de leur inoculation par *C. parvum*.

L'excrétion d'ookystes n'a pas été réduite dans ces lots traités par rapport au lot témoin. ($p > 0,05$)

Les résultats obtenus au cours de l'essai *in vitro* mettant en jeu des cellules humaines d'épithélium iléocæcal, n'ont pas été plus concluants.

Les auteurs ont conclu que l'efficacité du décoquinate contre *C. parvum* était faible *in vitro* et *in vivo*. Leurs résultats ne laissent pas espérer une meilleure efficacité chez les ruminants. Ils ont également suggéré que les bénéfices cliniques observés sur le terrain lors de l'utilisation empirique du décoquinate pour traiter des cryptosporidioses bovines, pourraient ne pas être dus au décoquinate mais à d'autres facteurs.

L'essai de MOORE *et al.* en 2003 n'a pas apporté de résultats plus encourageants.

Des veaux nouveau-nés, infectés expérimentalement par *C. parvum*, ont reçu 2 mg/kg/jour de décoquinate, pendant 28 jours. Le traitement n'a pas amélioré les signes cliniques ni réduit l'excrétion fécale d'ookystes par rapport à ce qui a été observé dans le lot témoin.

Certains auteurs ont évoqué une autre utilisation du décoquinate, susceptible de prévenir la cryptosporidiose :

La distribution de décoquinate aux mères permettrait de réduire l'excrétion maternelle d'ookystes en fin de gestation et donc la contamination des nouveau-nés.

Chez la vache il est recommandé d'administrer 1,25 mg/kg/jour de décoquinate, un mois avant le vêlage et 8 jours après.

Chez la brebis, la dose recommandée est 1,5 mg/kg/jour, 30 jours avant et 10 jours après l'agnelage.

En l'absence de LMR lait, cet emploi du décoquinate est réservé aux cheptels allaitants. (MUSNIER 2004)

L'intérêt de cette pratique ne fait pas l'unanimité puisque d'autres auteurs évoquent l'absence apparente de lien entre le portage chez les adultes et les épisodes cliniques chez les jeunes.

(CHARTIER 2001b)

D'un côté, il est vrai que plus la contamination initiale est élevée, plus les animaux infectés excrètent un grand nombre d'ookystes, qui contaminent davantage l'environnement des prochains jeunes à naître, et ainsi de suite.

D'un autre côté, le parasite est très répandu dans l'environnement et un animal à toutes les chances de s'infecter indépendamment de son contact avec les adultes. L'infection peut survenir pour seulement quelques ookystes ingérés. (MOORE *et al.* 2003)

Le rôle du portage des adultes n'est sans doute pas nul mais son importance est difficile à évaluer.

Le décoquinate est un anti-coccidien coccidiostatique utilisé à des fins préventives chez le veau et l'agneau sevrés. (DECCOX ND) (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2003)

Son efficacité dans la prévention de la cryptosporidiose est controversée.

Des essais sur veaux puis chevreaux infectés expérimentalement ont montrés des résultats assez encourageants, qui n'ont pas été confirmés par les essais suivants *in vitro* ou sur souris et veaux nouveau-nés. (REDMAN et FOX 1994, MANCASSOLA *et al.* 1997, LINDSAY *et al.* 2000, MOORE *et al.* 2003)

Des vétérinaires utilisent quand même le décoquinate pour prévenir la cryptosporidiose chez les jeunes ruminants. (MOORE *et al.* 2003, LINDSAY *et al.* 2000). Les doses utilisées sont nettement supérieures à celles indiquées dans le traitement de la coccidiose mais ces traitements sont bien tolérés. Leur efficacité n'est pas prouvée.

Plus récemment, des vétérinaires ont eu l'idée d'administrer du décoquinate aux mères avant et juste après la mise bas, de façon à réduire la contamination des nouveau-nés à leur contact. (MUSNIER 2004)

Cette pratique ne fait pas l'unanimité et n'est pas encore validée par des essais scientifiques. (CHARTIER 2001b)

(4)Le lasalocide

Le lasalocide est un antibiotique ionophore produit par *Streptomyces lasaliensis*. Il est doté d'une activité anti-protozoaire et est utilisé en médecine vétérinaire comme additif anticoccidien chez les volailles. (AVATEC ND)

Différents essais ont montré que le lasalocide était également doté d'une activité anticryptosporidienne, mais cette molécule est a priori toxique, en particulier chez le veau. (CASTRO-HERMIDA *et al.* 2000b)

Le lasalocide mérite toutefois une attention particulière car certains vétérinaires l'utilisent actuellement sur le terrain, chez l'agneau ou le chevreau, sans déplorer d'effets toxiques.

(a)Action anticryptosporidienne du lasalocide

CASTRO-HERMIDA *et al.* (2000b) ont incubé des ookystes de *C. parvum* dans 10 mL d'une suspension de lasalocide à 0,27 mg/mL, pendant 30, 60, 90 ou 120 minutes.

Plus le temps d'exposition avec la suspension avait été long, plus le nombre d'ookystes morts était élevé et plus les ookystes survivants perdaient leur capacité d'excystation. (Il n'y pas de lot d'ookystes témoins dans cette expérience.)

Les mêmes auteurs ont travaillé sur des souris nouveau-nés inoculées expérimentalement avec $2,5 \times 10^4$ ookystes.

Le lasalocide a été utilisé *per os*, en préventif ou en curatif, à raison de 9 ; 6,75 ; 5,625 et 4,5 mg/kg, selon les lots de souris.

Les traitements préventifs ont été administré une heure avant l'inoculation puis toutes les 24 heures (9 mg/kg) ou 12 heures (9 ; 6,75 ; 5,625 et 4,5 mg/kg), pendant 2 jours.

En curatif, le lasalocide a été administré les 3, 4 et 5^{èmes} jours post-inoculation, toutes les 24 heures (9 mg/kg) ou 12 heures (9 ; 6,75 ; 5,625 et 4,5 mg/kg).

Les souris ont été sacrifiées 7 jours après l'inoculation et les ookystes présents dans l'intestin ont été dénombrés.

Tous les dosages et rythmes d'administration ci-dessus ont réduit significativement le nombre d'ookystes dans l'intestin des souris traitées. ($p < 0,05$)

Les traitements curatifs et préventifs avec des doses de 6,75 ou 9 mg/kg toutes les 12 heures

ont même permis d'éradiquer l'infection.
Aucun effet toxique visible n'a été noté.

Gobel (1987) a obtenu des résultats intéressants en curatif chez des veaux infectés expérimentalement par 3×10^6 ookystes à 4 ou 5 jours d'âge.

Ces veaux ont reçu 15 mg/kg/jour de lasalocide, 4 jours après l'inoculation (les veaux étaient donc âgés de 8 ou 9 jours), pendant 3 jours. Un traitement symptomatique à base de charbon et d'électrolytes a complété l'intervention.

L'excrétion fécale d'ookystes a cessé 3 jours après l'arrêt du traitement chez tous les veaux. Il n'y a pas eu de lot témoin dans cet essai pour comparer ces résultats à l'évolution de la maladie chez des veaux non traités. Cependant l'auteur a estimé que ses observations étaient prometteuses si on les comparait à l'évolution habituellement plus longue des cryptosporidioses expérimentales chez le veau.

Gobel a obtenu des résultats similaires chez des veaux en conditions naturelles.

Pongs (1989) a traité 15 veaux diarrhéiques, âgés de 4 jours à 4 semaines et infectés naturellement par *C. parvum*, à l'aide de lasalocide 3 mg/kg/jour et de charbon, pendant 3 jours. Les signes cliniques ont cessé chez tous ces veaux, les deuxième ou troisième jours de traitement. L'excrétion d'ookystes n'était plus détectable le troisième jour. Cet essai n'a pas eu non plus de lot témoin mais là aussi l'auteur a jugé les résultats prometteurs, sans doute en raison de l'évolution normalement plus longue de la maladie, au moins chez les veaux de 4 jours. Le traitement a été bien toléré.

Ces résultats obtenus chez le veau n'ont jamais été confirmés par des études ultérieures. (CHARTIER 1999)

(b) Toxicité chez le veau nouveau-né

En l'absence de recommandations clairement établies concernant les modalités d'emploi du lasalocide dans le traitement de la cryptosporidiose, c'est une molécule qui a été utilisée assez empiriquement sur le terrain. (BENSON *et al.* 1998) Cette pratique s'est soldée par de nombreux accidents.

BENSON *et al.* (1998) ont décrit le cas de trois veaux nouveau-nés intoxiqués après une ingestion unique de 200 mg de lasalocide (soit ≈ 4 à 5 mg/kg) : ces veaux ont été retrouvés

morts ou en décubitus latéral et opisthotonos dans les 12 à 24 heures.

Les auteurs ont également étudié le cas d'un veau de 36 heures, mort après un épisode de dyspnée et ataxie. Ce veau recevait 200 mg/jour de lasalocide depuis la naissance (3 prises au total avant le décès). Aucun agent pathogène ni aucune anomalie congénitale n'ont été retrouvés à l'examen nécropsique. Aucun décès comparable n'a été enregistré dans l'exploitation d'origine de ce veau, dès que le traitement à base de lasalocide a été supprimé.

Suite à ces observations de terrain, les auteurs ont administré 200 mg/kg toutes les 12 heures à des veaux âgés de 12 heures environ.

Dans les 12 heures suivant la première administration, les veaux sont devenus prostrés, dyspnéiques et ataxiques. L'évolution s'est faite rapidement vers un décubitus avec opisthotonos, les animaux sont morts 36 heures après le début du traitement.

Un bilan biochimique complet a été enregistré en continu sur ces veaux. Les seules modifications notables ont été une élévation rapide des sérum aspartate amino-transférases (292 UI/L ; normes : 55-125 UI/L) et des créatine-kinases (9 570 UI/L ; normes : 1-350 UI/L).

Les auteurs ont également noté une tachycardie qui a débuté 90 minutes après le début du traitement et s'est maintenue jusqu'au décès.

L'examen nécropsique a révélé une congestion pulmonaire marquée, les muscles squelettiques étaient oedémateux, modérément hémorragiques et nécrotiques. Le myocarde était le siège de nombreux foyers de nécrose, de même que les papilles ruminales.

Une toxicité comparable avait été déjà été observée par MOON *et al.* (1982) puis JOHNSON (1992) avec des doses respectives de 8 mg/kg et 3 mg/kg/jour de lasalocide, toujours chez des veaux nouveau-nés.

Les ionophores sont des molécules capables de capter des ions. Le lasalocide capte les cations divalents, calcium et magnésium et perturbe ainsi les flux d'ions à travers les membranes cellulaires. Les pompes ioniques ATP-ases membranaires corrigent les déséquilibres dans un premier temps, puis l'ATP fait défaut et les mécanismes compensateurs sont débordés. Les gradients ioniques sont anéantis et la cellule meurt. Les fibres musculaires squelettiques et myocardiques sont particulièrement sensibles à ces modifications. (Mc KELLAR et LAWRENCE 1996, BENSON *et al.* 1998)

La toxicité du lasalocide, désormais bien décrite, semble particulièrement marquée chez le

veau nouveau-né, âgé de moins de 7 jours. La plus petite dose toxique n'est pas établie, les accidents surviennent pour des doses variables. Les veaux plus âgés seraient moins sensibles, sous réserve que les doses utilisées soient ≤ 15 mg/kg/jour, à en juger par les essais de GOBEL (1987) et PONGS (1989). (BENSON *et al.* 1998)

(c) Utilisation chez l'agneau et le chevreau

Actuellement, le lasalocide est utilisé par certains praticiens pour traiter la cryptosporidiose chez les agneaux et les chevreaux. La dose recommandée est 3,75 mg/kg/jour pendant 3 jours. Lorsqu'un agneau est confirmé infecté par *C. parvum*, tous les agneaux du même lot doivent être traités. Il est inutile de traiter préventivement tous les futurs jeunes à naître des lots suivants. (PONCELET 2003)

Ce traitement est bien toléré mais n'a pas été validé par des essais scientifiques.

Le lasalocide est un antibiotique ionophore coccidiostatique, utilisé chez les volailles comme additif anti-coccidien. (AVATEC ND)

Il serait partiellement actif contre *C. parvum* (GOBEL 1987, PONGS 1989, CASTRO-HERMIDA *et al.* 2000b) mais est très mal toléré par les veaux, en particulier ceux âgés de moins de 7 jours. (BENSON *et al.* 1998)

C'est une molécule qui est tout de même utilisée par certains praticiens sur les agneaux et chevreaux. (PONCELET 2003) Cette pratique serait efficace mais n'a pas été validée par des essais scientifiques. Par ailleurs, le lasalocide n'a pas de LMR, il ne peut donc pas être prescrit ou légalement utilisé chez les ruminants. (PONCELET 2003)

(5) Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques, naturels. Certains de leurs dérivés sont utilisés comme excipients depuis quelques années. Ils améliorent la solubilité et la stabilité des certains principes actifs avec lesquels ils forment des complexes.

Leur activité anti-cryptosporidienne était inattendue. (CASTRO-HERMIDA *et al.* 2000a)

(a) Propriétés pharmacologiques et mécanismes d'action

Les cyclodextrines administrées *per os* ne sont pas absorbées.

(CASTRO-HERMIDA *et al.* 2004)

La β -cyclodextrine modifierait la perméabilité de la membrane des ookystes de *C. parvum*.

(CASTRO-HERMIDA *et al.* 2000a)

(b) Essais thérapeutiques

(i) Essai in vitro

Dans l'essai de CASTRO-HERMIDA *et al.* (2000a), des ookystes ont été incubés dans 10 mL d'une suspension de β -cyclodextrine ou dans 10 mL d'eau distillée stérile (ookystes témoins) pendant 24 heures.

81,5 % des ookystes traités par la β -cyclodextrine n'étaient plus viables suite au traitement.

Seuls 19 % des ookystes témoins n'étaient plus viables au même moment.

Ces résultats illustrent l'activité anticryptosporidienne de la β -cyclodextrine *in vitro*.

(ii) Essais in vivo

Suite aux résultats observés *in vitro*, les précédents auteurs ont réalisé différentes expériences

sur des souriceaux.

Plusieurs lots ont été constitués, et les auteurs ont mesuré la prévalence et l'intensité de l'infection par *C. parvum* dans chaque lot, 7 jours après l'infection expérimentale.

- ▶ **Lot 1**(témoin) : souriceaux inoculés par des ookystes non traités
- ▶ **Lot 2** : souriceaux inoculés par des ookystes issus de l'essai *in vitro* précédent, soit préalablement traités par la cyclodextrine
- ▶ **Lots 3, 4 et 5**: souriceaux inoculés par des ookystes non traités. Ces souriceaux ont reçu 0,1 ml d'une suspension de cyclodextrine à 2,5 %, *per os*, 1heure avant l'infection (lot 3 et 4) ou 2 heures avant (lot 5). Les souriceaux sont également traités le lendemain et le surlendemain de l'inoculation ; une fois par jour (lot 3) ou deux fois par jour (lots 4 et 5).
- ▶ **Lots 6, 7 et 8** : souriceaux inoculés par des ookystes non traités. Ces souriceaux ont reçu 0,1 ml d'une suspension de cyclodextrine à 2,5 %, *per os*, à J3, J4, et J5 après l'infection.

Le traitement a commencé 24 heures, 12 heures ou 8 heures après l'inoculation respectivement pour les lots 6, 7 et 8.

Les résultats de l'essai figurent dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Intensité de l'infection et pourcentage de souriceaux infectés par *C. parvum* dans chaque lot (témoin et traités par de la β -cyclodextrine) de l'essai de CASTRO-HERMIDA *et al.* (2000a)

	Intensité de l'infection (nombre moyen d'ookystes $\times 10^6$ dans l'intestin) \pm erreur type	% de souriceaux infectés
Lot témoin	2,6 \pm 1,6	100
Lot 2	0,6 \pm 0,3	100
Lot 3	0,3 \pm 0,1	100
Lot 4	0,1 \pm 0,1	100
Lot 5	0,0 \pm 0,0	0
Lot 6	0,2 \pm 0,1	100
Lot 7	0,1 \pm 0,0	33,3
Lot 8	0,1 \pm 0,0	6,2

(CASTRO-HERMIDA *et al.* 2000a)

Les auteurs ont observé que chez la souris :

- ▶ Les ookystes préalablement incubés dans la β -cyclodextrine, ont conservé leur infectiosité mais l'infection résultante a été atténuée.
- ▶ La β -cyclodextrine à la dose utilisée, permet de prévenir l'infection par *C. parvum*. L'infection est totalement éradiquée dans le lot 5, traité 2 heures avant l'inoculation.
- ▶ La β -cyclodextrine, est intéressante également en traitement curatif : elle réduit l'intensité de l'infection et parfois la prévalence de l'infection selon le délai entre l'inoculation et le début du traitement.

Des résultats similaires ont été obtenus avec l' α -cyclodextrine. (CASTRO-HERMIDA et ARES-MAZAS 2003)

CASTRO-HERMIDA *et al.* 2001a, ont obtenu des résultats intéressants sur des agneaux nouveau-nés naturellement infectés. Un lot d'agneaux a reçu de la β -cyclodextrine en suspension aqueuse, à raison de 500 mg/kg/jour, *per os*, pendant leurs 3 premiers jours de vie.

Dans ce lot traité préventivement, la prévalence de l'infection, la durée de la période d'excrétion et des diarrhées, ont été diminuées par rapport au lot témoin. La période pré-patente a été allongée.

Un deuxième lot d'agneaux a été traité à la même posologie mais pendant les 3 jours suivant les premières diarrhées. Ce traitement a diminué la sévérité des diarrhées et la durée de la période d'excrétion.

Le traitement a été bien toléré.

Des résultats similaires ont été obtenus chez des veaux infectés naturellement. (CASTRO-HERMIDA *et al.* 2001b)

L' α -cyclodextrine s'est révélée prometteuse chez des chevreaux infectés expérimentalement au cours de leurs 6 premiers jours de vie.

Les chevreaux traités ont reçu 500 mg/kg/jour d' α -cyclodextrine, *per os*, pendant 6 jours, à partir du jour de leur inoculation.

Ce traitement a été suivi d'un allongement significatif de la période pré-patente, d'une réduction significative de l'intensité de l'excrétion d'ookystes et de la durée de cette

excrétion.

Un seul des 10 animaux traités a présenté de la diarrhée, tandis qu'elle a touché les 10 chevreaux du lot témoin.

Les auteurs ont conclu que l' α -cyclodextrine pourrait trouver sa place dans le traitement préventif de la cryptosporidiose chez le chevreau, après que la posologie et la durée de traitement optimales aient été déterminées.

La formulation de l' α -cyclodextrine utilisée dans cet essai (quatre gros comprimés par prise) semble inappropriée chez le chevreau nouveau-né car elle est difficile à avaler. Quatre chevreaux traités sont morts en cours de traitement, l'autopsie et les examens bactériologiques de ces animaux n'ont rien révélé si ce n'est un tube digestif vide. Il semble que l'administration de cette forme d' α -cyclodextrine soit trop longue et stressante pour les chevreaux nouveau-nés qui refusent ensuite de se nourrir.

La molécule n'est pratiquement pas toxique mais les auteurs ne peuvent écarter une autre hypothèse selon laquelle des modifications particulières chez les nouveau-nés seraient à l'origine d'effets secondaires. (CASTRO-HERMIDA *et al.* 2004)

Les cyclodextrines sont des excipients oligosaccharidiques qui ont montré une efficacité inattendue dans le traitement préventif et curatif de la cryptosporidiose *in vitro* et dans différents modèles animaux infectés expérimentalement ou naturellement. Elles pourraient représenter une piste thérapeutique intéressante.

(6) Les essais vaccinaux

(a) La vaccination des mères

Chez les ruminants comme chez tous les mammifères euthériens à l'exception des primates, lagomorphes et rongeurs, le placenta est imperméable aux immunoglobulines. Les jeunes naissent hypo ou agammaglobulinémiques et ont besoin d'un soutien immunitaire passif le temps que leurs propres réactions immunitaires se mettent en place. Ce soutien est apporté par le colostrum, riche en anticorps, puis par la protection lactée. (SALMON 1999)

La vaccination des mères contre *C. parvum* pourrait assurer une immunoprophylaxie passive des jeunes *via* le colostrum et le lait.

Le recours au colostrum bovin hyperimmun a permis de réduire l'excrétion fécale d'ookystes et l'intensité des signes cliniques chez des patients humains immunodéprimés et infectés par *C. parvum*. (TZIPORI *et al.* 1986, GREENBERG et CELLO 1996)

Ces observations ont suscité de nombreux autres essais dans différentes espèces animales. Signalons quand même que dans les filières lait (cas de la filière caprine) il n'est pas envisageable de laisser les jeunes sous la mère.

(i) Mécanismes d'action

NACIRI *et al.* (1994) ont montré qu'il n'y avait a priori pas de lien entre le taux sérique d'anticorps chez l'agneau nouveau-né et le contrôle de la cryptosporidiose chez ces individus. Les anticorps colostraux protecteurs agiraient localement dans la lumière intestinale où ils neutraliseraient les sporozoïtes avant que ceux-ci n'infectent les cellules épithéliales.

(ii) Essais d'immunisation des mères par l'ookyste entier de *C. parvum*

Dans l'essai de FAYER *et al.* (1989), des veaux nouveau-nés ont reçu 1L de colostrum de

vaches hyperimmunisées contre l'ookyste entier de *C. parvum*. Le lot de veaux témoins a reçu du colostrum bovin normal. Tous ont été infectés expérimentalement par des ookystes de *C. parvum*, 3 jours après leur naissance. La fréquence et la gravité des diarrhées ainsi que l'intensité de l'excrétion fécale d'ookystes ont été significativement inférieures dans le lot traité. Le colostrum hyperimmun utilisé dans cet essai a partiellement prévenu la cryptosporidiose.

NACIRI *et al.* (1994) ont montré que chez l'agneau infecté expérimentalement à 2 jours d'âge (avec 10^6 ookystes), la tétée d'une brebis hyperimmunisée avec l'ookyste entier, était partiellement protectrice contre l'infection par *C. parvum*.

Dans ce lot d'agneaux, l'excrétion fécale d'ookystes a été retardée de 24 heures et a été moins intense que celle observée dans le lot d'agneaux allaités par des brebis non immunisées spécifiquement. Par ailleurs les agneaux du lot traité n'ont pas eu de diarrhées à l'inverse des agneaux témoins.

Au cours de ce même essai, un autre lot d'agneaux a été séparé des mères dès la naissance. Ces nouveau-nés ont reçu 50 mL de colostrum bovin hyperimmun (immunisation de vaches par l'ookyste entier) pendant 7 jours, puis un lactoreplaceur.

Ce protocole a assuré une protection supérieure à celles observée dans les lots décrits précédemment : aucun symptôme de cryptosporidiose n'a été observé et l'excrétion fécale d'ookystes a été moindre.

Dans le colostrum, le taux d'anticorps décroît très rapidement, les agneaux sous les mères ont donc reçu un colostrum qui s'est appauvri très vite. Au contraire, le dernier lot d'agneaux a reçu un colostrum « riche » pendant 7 jours puisque tout le colostrum bovin utilisé pour l'essai était issu de la première traite des vaches vèlées.

Les auteurs ont donc conclu que l'immunoprophylaxie passive de la cryptosporidiose nécessitait une forte concentration d'anticorps spécifiques dans la lumière intestinale. Cette concentration doit être maintenue sur une période assez longue : entre la naissance et la fin de la période prépatente dans le cas d'une infection expérimentale.

Cette hypothèse pourrait expliquer que la protection obtenue chez le veau avec une buvée unique de colostrum hyperimmun (FAYER *et al.* 1989), n'ait pas suffi à prévenir les signes cliniques de la cryptosporidiose. (NACIRI *et al.* 1994)

La réalisation d'une telle immunoprophylaxie se heurte à plusieurs obstacles :

- ▶ L'obtention d'un colostrum hyperimmun passe par l'immunisation des mères

gestantes avec un très grand nombre d'ookystes purifiés, c'est un protocole lourd (JENKINS *et al.* 1998) et trop coûteux pour une production en routine. (SAGODIRA *et al.* 1999)

- ▶ Le colostrum ainsi obtenu à partir d'ookystes entiers, contient des anticorps protecteurs et une part inutile d'anticorps non protecteurs. (JENKINS *et al.* 1998)

L'objectif étant l'obtention d'un colostrum riche en anticorps protecteurs, des antigènes de *C. parvum* spécifiquement impliqués dans l'immunité intestinale passive du jeune, ont été identifiés.

(iii) Immunisation des mères par des antigènes spécifiques

○ Antigène de surface CP15/60

JENKINS *al.* (1998) ont testé l'efficacité du colostrum de vaches hyperimmunisées avec des plasmides (ADN) codant l'antigène de surface CP15/60 de l'ookyste et du sporozoïte de *C. parvum*.

Chez des souris immunodéprimées et infectées expérimentalement par 10^3 ookystes, ce colostrum a été partiellement protecteur. Les souris traitées ont reçu 250 μ L de ce colostrum de première traite, toutes les 12 heures, pendant 4 jours, en commençant 12 heures avant l'infection. Le quatrième jour, la quantité de parasites dans l'iléon de ces souris était réduite de moitié comparée à celle observée chez les témoins ayant reçu un colostrum bovin normal. En revanche, ce même traitement n'a apporté aucun bénéfice sur des souris infectées par 10^4 ookystes au lieu de 10^3 .

Les auteurs ont supposé que les capacités protectrices de ce colostrum étaient dépassées si les parasites étaient trop nombreux.

Elles pourraient être améliorées par des administrations de colostrum plus nombreuses et plus rapprochées ou par la réalisation d'un colostrum riche en anticorps spécifiquement dirigés contre un plus grand nombre d'antigènes impliqués dans la réaction immunitaire. L'utilisation d'adjuvants comme les liposomes lors de l'immunisation des mères par l'ADN pourrait aussi conduire à un colostrum plus riche.

Dans l'essai de SAGODIRA *et al.* (1999) chez les caprins, la vaccination de mères gestantes avec ce même plasmide a assuré une protection partielle des chevreaux nouveau-nés infectés expérimentalement à l'âge d'un jour avec 10^6 ookystes. Les chevreaux nourris par leur mère vaccinée ont excrété moins d'ookystes et ont eu une croissance supérieure par rapport aux chevreaux de mères non vaccinées. Ces différences étaient significatives.

○ *Protéine recombinante rC7*

PERRYMAN *et al.* (1999) ont montré que l'hyperimmunisation de vaches par la protéine recombinante rC7 de *C. parvum* pouvait protéger efficacement des veaux nouveau-nés infectés expérimentalement avec 10^7 ookystes.

Les veaux traités ont reçu du colostrum hyperimmun dans les 2 heures suivant leur naissance, puis à l'âge de 12 puis 24 heures. Les témoins ont reçu un colostrum normal aux mêmes heures. Tous les veaux ont été infectés à l'âge de 12 heures.

Tous les témoins ont développé une diarrhée sévère et ont excrété d'importantes quantités d'ookystes. Au contraire, les veaux traités sont restés asymptomatiques et ont excrété significativement moins d'ookystes.

La protéine rC7 est présente à la surface des sporozoïtes et des mérozoïtes ; elle possède au moins deux épitopes reconnus par des anticorps neutralisants protecteurs. Le colostrum hyperimmun utilisé dans cet essai était donc riche en anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes parasitaires très impliqués dans la réponse protectrice.

(b) La vaccination des nouveau-nés

C. parvum devient intracellulaire au cours des premières heures de son cycle biologique. Il est donc très rapidement à l'abri des anticorps colostraux.

De plus il a été montré que la protection contre la cryptosporidiose provenait essentiellement d'une réponse à médiation cellulaire.

Les sécrétions mammaires contiennent des leucocytes. Ces leucocytes sont transmis au nouveau-né et restent viables dans les heures suivant l'ingestion. Néanmoins le rôle de ces cellules dans la protection du nouveau-né n'est pas clairement défini, d'autant plus que ces

leucocytes sont peu nombreux. (HARP et GOFF 1998, SALMON 1999)

Ces observations expliquent en partie les difficultés parfois rencontrées lors de la recherche d'une protection des jeunes via le colostrum.

La vaccination des jeunes eux-mêmes génère une protection humorale et cellulaire.

HARP et GOFF (1998) ont vacciné oralement des veaux nouveau-nés à l'aide d'une suspension d'ookystes tués et purifiés. Ces veaux ont été infectés expérimentalement à l'âge de 7 jours. Cette vaccination a réduit significativement la durée des diarrhées et de l'excrétion d'ookystes par rapport aux témoins non vaccinés.

Le même protocole vaccinal échoue en conditions naturelles : la protection vaccinale survient trop tardivement lors de l'infection naturelle qui a lieu dès le premier jour de vie.

Les mêmes auteurs cherchent actuellement à élaborer un vaccin protecteur dans un délai moindre.

La protection des jeunes ruminants contre la cryptosporidiose par l'ingestion de colostrum issu de mères hyperimmunisées contre *C. parvum* s'est avérée partiellement possible au cours de plusieurs essais conduits en station. (FAYER *et al.* 1989, PERRYMAN *et al.* 1999, JENKINS *et al.* 1998, SAGODIRA *et al.* 1999)

Il semble que des anticorps colostraux spécifiques neutralisent les sporozoïtes dans la lumière intestinale, avant que ceux-ci n'infectent les cellules épithéliales.

La protection n'est réellement efficace que lorsque la concentration en anticorps colostraux protecteurs dans la lumière intestinale est élevée et maintenue comme telle entre la naissance et la fin de la période prépatente. (JENKINS *et al.* 1998) La vaccination des mères par des antigènes fortement et précocement impliqués dans l'immunité intestinale passive des jeunes s'est avérée particulièrement intéressante. (Antigène CP15-ADN ou protéine recombinante rC7)

Ces résultats prometteurs ont été obtenus dans le contexte d'une infection expérimentale unique des nouveau-nés concernés. Des essais devraient être poursuivis en conditions naturelles où un obstacle semble susceptible d'entraver le succès de la méthode :

La concentration d'anticorps dans le colostrum décroît rapidement ; le colostrum des jeunes sous la mère risque de ne pas agir suffisamment longtemps pour être protecteur lorsque la pression infectieuse est maintenue.

Par ailleurs, dans la filière caprine, les chevreaux sont mis à l'allaitement artificiel dès leurs premiers jours de vie ; le lait des mères étant le premier produit de la filière.

La vaccination des nouveau-nés a l'avantage de générer une réponse à médiation cellulaire. Cependant l'infection survient dès le premier jour de vie il n'y a actuellement pas de vaccin protecteur dans un délai suffisant.

(7) Les probiotiques et la putrescine

L'utilisation des probiotiques ou de la putrescine pour prévenir ou traiter la cryptosporidiose a résulté des observations suivantes :

- ▶ Les nouveau-nés sont particulièrement sensibles à *C. parvum*. Ils deviennent naturellement plus résistants à un âge qui coïncide avec le sevrage, l'acquisition d'une flore intestinale équilibrée et la maturation de l'épithélium intestinal.
- ▶ La prolifération et la maturation de l'épithélium intestinal sont induites par des polyamines produites par la flore intestinale et dont la concentration augmente au moment du sevrage.
- ▶ La putrescine est une polyamine issue du métabolisme de l'ornithine, elle agit localement dans la lumière intestinale où elle contribue à la maturation des entérocytes. (WATERS *et al.* 1997)

Il s'avère pourtant que les probiotiques en conditions naturelles ne semblent pas efficaces sur l'excrétion d'ookystes ni sur la diarrhée. (CHARTIER 1999)

La putrescine a donné des résultats prometteurs chez les nouveau-nés de souris inoculés expérimentalement. Les souris traitées préventivement tous les jours, de 3 jours au sevrage (à 21 jours), ont été quasi résistantes à l'infection et ont excrété très peu d'ookystes par rapport aux souris témoins. (WATERS *et al.* 1997)

Chez le veau, le traitement préventif par la putrescine à 400 mg/kg/jour n'a pas montré d'efficacité au cours de l'essai (non publié) réalisé par les auteurs précédents. Aucune amélioration n'a été observée dans le lot traité comparé au lot témoin. De plus, la putrescine à cette posologie, a présenté une toxicité neurologique chez le veau qui a justifié l'euthanasie de certains animaux traités. (CHARTIER 1999)

<p>Le recours aux probiotiques et aux polyamines impliquées dans la maturation des entérocytes est une piste originale, fondée sur l'observation des modifications intestinales attenantes au sevrage et à l'acquisition d'une meilleure résistance à la cryptosporidiose.</p>

A ce jour, les résultats obtenus chez les ruminants sont décevants.

(8) La nitazoxanide

La nitazoxanide est un dérivé du nitrothiazolyl-salicylamide, doté d'une activité anthelminthique (cestodes en particulier), antibactérienne et antiprotozoaire. Sa structure est proche de celle de l'acide acétylsalicylique. (FAYER 2004, ROASEAU 2003)

Elle se présente sous la forme d'une poudre cristalline jaune pâle, pratiquement insoluble dans l'eau. (ANONYME 2002)

Son efficacité est reconnue dans le traitement de différentes protozooses intestinales chez l'homme, notamment la giardiose, pour laquelle elle représente un bon traitement alternatif au métronidazole : (FLAGYL ND) (ROASEAU 2003)

(a) Propriétés pharmacologiques et mode d'action

Les propriétés pharmacologiques de la nitazoxanide sont assez bien décrites chez l'homme.

La nitazoxanide, administrée par voie orale, est rapidement absorbée et métabolisée par le foie, où des réactions d'hydrolyse et de glucuroconjugaison conduisent aux deux métabolites actifs de la molécule : la tizoxanide et la tizoxanide glucuronide.

Ces biotransformations sont rapides : chez des enfants âgés de 1 à 4 ans, le pic plasmatique de tizoxanide survient 3,5 heures après l'ingestion de 100 mg de nitazoxanide.

Ce pic survient dès la deuxième heure suivant l'ingestion de 200 mg de nitazoxanide par des enfants plus âgés, de 4 à 11 ans.

Le pic plasmatique de tizoxanide glucuronide se produit en moyenne 4 heures après l'ingestion de nitazoxanide.

Ces métabolites sont largement distribués dans les tissus et leur biodisponibilité est supérieure lorsque la nitazoxanide a été administrée au cours d'un repas.

Ils sont ensuite éliminés par les urines et plus massivement par voie biliaire.

La demi-vie d'élimination de la tizoxanide est comprise entre 1 et 4 heures, celle de la

tizoxanide glucuronide est un peu plus longue : de 2 à 10 heures. (STOCKIS *et al.* 2002, ANONYME 2002)

La nitazoxanide semble tenir son activité anti-protozoaire de ses capacités d'interférences avec la pyruvate ferredoxine oxydo-réductase, une enzyme nécessaire au métabolisme énergétique anaérobie qui assure la croissance des ookystes et des sporozoïtes. (ANONYME 2002)

(b)Essais thérapeutiques et toxicité

(i)Essai in vitro

La molécule s'est avérée très efficace contre *C. parvum in vitro*. Elle a permis de réduire de 90 % la multiplication du parasite au sein de cellules traitées, par rapport aux cellules infectées mais non traitées ; cela au cours d'un protocole standardisé pour l'évaluation de l'activité anticryptosporidienne de nombreuses substances. Ce même essai a montré une cytotoxicité très faible. (THEODOS *et al.* 1998)

(ii)Essais in vivo

(a)Efficacité dans des modèles animaux

Les essais *in vivo* dans différents modèles animaux ont eu des résultats variables.

BLAGBURN *et al.* (1998) ont montré une action préventive partielle et dose dépendante de la nitazoxanide chez le souriceau nouveau-né.

La nitazoxanide a été administrée pendant 7 jours, à raison de 100 mg/kg/jour ou 150 mg/kg/jour. La dose de 150 mg/kg a été la plus efficace : le niveau d'excrétion d'ookystes dans le lot traité a atteint moins de 5 % de l'excrétion dans le lot non traité.

Suite aux résultats encourageants qu'ils avaient observé *in vitro*, THEODOS *et al.* (1998) ont évalué l'efficacité curative de la nitazoxanide chez la souris puis le porcelet.

Le traitement curatif de souris immunodéprimées et infectées expérimentalement par *C. parvum*, avec 100 ou 200 mg/kg par jour, pendant 10 jours, n'a pas réduit pas la quantité d'ookystes excrétés par rapport au lot témoin.

L'essai chez le porcelet nouveau-né, infecté expérimentalement, a mis en évidence une efficacité partielle de la nitazoxanide à 250 mg/kg par jour, administrée pendant 11 jours, dès l'apparition des diarrhées.

Les porcelets traités ont excrétés significativement moins d'ookystes que les témoins ($p=0,001$). Le traitement a également permis une réduction significative de la surface de la muqueuse digestive infectée. ($p=0,025$). Cependant, les diarrhées sont restées aussi fréquentes dans les deux groupes.

Un essai supplémentaire chez des porcelets non infectés par *C. parvum*, a montré que la nitazoxanide utilisée à cette posologie, provoquait des diarrhées chez certains animaux ($p<0,001$). Cette donnée peut expliquer l'absence d'amélioration des diarrhées chez les porcelets infectés et traités, par rapport aux témoins, cela en dépit d'une action significative de la molécule sur le taux d'excrétion d'ookystes et l'étendue de l'infection.

L'essai a donc été renouvelé en utilisant une dose plus faible de nitazoxanide mais les 125 mg/kg utilisés n'ont pas permis d'amélioration significative des paramètres étudiés par rapport à un lot témoin ($p=0,282$). Ces porcelets n'ont par contre pas présenté de diarrhée liée à la prise de nitazoxanide.

Les auteurs ont conclu à une efficacité curative partielle de la nitazoxanide à 250 mg/kg chez le porcelet. Un tel traitement est susceptible d'induire des diarrhées.

L'essai de LI *et al.* en 2003, a également illustré l'efficacité curative partielle et dose-dépendante de la nitazoxanide.

La nitazoxanide a été administrée, pendant 7 jours, à des rats adultes immunodéprimés et infectés expérimentalement par *C. parvum*.

Des doses de 50, 100 et 200 mg/kg ont été testées. Toutes ont assuré une baisse significative du nombre d'ookystes excrétés ($p<0,05$) dès le deuxième jour de traitement. Cette inhibition a été maintenue 7 jours après la fin du traitement puis l'excrétion d'ookystes est redevenue comparable à ce qu'elle était avant le traitement.

Les mêmes auteurs ont comparés ces résultats à ceux observés dans un autre lot de rats traités par la paromomycine à la dose thérapeutique classiquement utilisée, 100 mg/kg/jour.

Ce traitement a réduit significativement le nombre d'ookystes excrétés à partir du troisième jour d'observance. L'action anti-cryptosporidienne de la paromomycine est apparue un peu plus tardivement que celle de la nitazoxanide.

Sept jours après l'initiation du traitement à base de paromomycine l'excrétion d'ookystes a été réduite de 90 % par rapport au lot témoin. La nitazoxanide à 200 mg/kg/jour n'a réduit l'excrétion que de 70 % le même jour ; cette réduction a été maximale 2 jours plus tard et a atteint 80 % à peine.

Dans le lot traité par la paromomycine, l'inhibition de l'excrétion d'ookystes n'a été maintenue que 3 jours après la fin du traitement.

La corrélation de ces résultats avec l'état clinique des animaux n'est pas disponible pour juger de la supériorité d'une des ces molécules en terme de traitement.

Toutefois, la nitazoxanide pourrait être plus intéressante pour sa rémanence, liée à la séquestration biliaire de ses métabolites actifs. (LI *et al.* 2003)

Les différences observées dans les précédents résultats *in vivo* pourraient s'expliquer au moins partiellement par une formulation différente de la nitazoxanide selon les essais.

La nitazoxanide administrée dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 100 % est caractérisée par une absorption et une élimination très rapide qui pourrait justifier son inefficacité dans l'essai de THEODOS *et al.* sur souris immunodéprimées en 1998. (LI *et al.* 2003)

La dose administrée, le modèle animal utilisé et la dose utilisée pour le modèle choisi sont d'autres facteurs de variation qu'il conviendrait d'évaluer. (LI *et al.* 2003)

(b) Toxicité

Les essais de toxicité *in vivo* ont établi une DL50 supérieure à 10 g/kg chez le rat, le chat et le chien et égale à 1,4 g/kg chez la souris.

La toxicité systémique a été évaluée chez des rats traités 14 jours à raison de 50, 150 et 450 mg/kg en trois prises quotidiennes. Les rats les plus fortement traités ont manifesté une salivation importante ainsi qu'une hépatomégalie, une splénomégalie et une réduction du poids de leur thymus. La nitazoxanide est un composé très peu toxique mais la DL50 semble très variable d'une espèce à l'autre. (MURPHY et FRIEDMANN 1985)

(c) Chez l'homme

Les résultats variables des précédents essais ont néanmoins laissé entrevoir la possibilité d'une efficacité de la nitazoxanide dans le traitement de la cryptosporidiose chez l'homme.

Chez l'homme immunocompétent, la cryptosporidiose se traduit par une gastro-entérite aiguë. Elle se résout souvent seule mais peut aussi persister plusieurs semaines. (ANONYME 2005a)

L'administration de nitazoxanide, pendant 3 jours, à raison de 1 000 mg pour un adulte malade, a permis de réduire la durée des symptômes et la quantité d'ookystes excrétés ($p < 0,0001$). L'essai a porté sur des sujets immunocompétents d'âges différents, des enfants dès 12 mois et des adultes. Les résultats ont été semblables dans tous les cas. Des effets secondaires ont été notés chez des sujets traités par la nitazoxanide, mais ils sont identiques en nature et en fréquence à ceux rapportés par le groupe ayant reçu un placebo. (ROSSIGNOL *et al.* 2001)

Ces observations ont contribué à la mise sur le marché de la molécule : ALINIA ND est le premier et l'unique médicament approuvé par la Food and Drug Administration.

Il est indiqué pour le traitement des diarrhées à *C. parvum* et *G. intestinalis* chez l'enfant aux Etats-Unis, où il est disponible en pharmacie depuis février 2003. (ANONYME 2005a)

La nitazoxanide doit alors être administrée deux fois par jour pendant trois jours, au cours des repas, à raison de 100 mg par prise chez l'enfant âgé de 12 à 47 mois et de 200 mg par prise chez l'enfant de 4 à 11 ans.

Dans ces conditions, des effets secondaires peuvent survenir mais ils sont généralement modérés et transitoires : il peut s'agir de céphalées, fatigue, douleurs abdominales, rares cas de vertiges, diarrhées ou vomissements et hypotension. (Le lien de cause à effet n'a pas été prouvé pour cette dernière manifestation)

Les urines prennent souvent une couleur jaune vert au cours du traitement. Le traitement est très bien toléré dans l'ensemble. (ROASEAU 2003)

Le recours à la nitazoxanide pour traiter la cryptosporidiose d'humains immunodéprimés fait encore l'objet de nombreux essais. Les résultats obtenus jusqu'alors sont plus variables. L'efficacité de la nitazoxanide dans le traitement de ces cryptosporidioses chroniques doit encore être précisée mais un médicament, le CRYPTASE ND, est d'ores et déjà utilisé en

France ; son usage reste strictement réservé aux médecins hospitaliers. (THEODOS *et al.* 1998)

La nitazoxanide suscite de nombreux espoirs d'application dans le traitement des cryptosporidioses humaines ou animales.

Plusieurs essais ont montré son efficacité partielle pour traiter ou pour prévenir la cryptosporidiose dans différentes espèces animales. (THEODOS *et al.* 1998 ; BLAGBURN *et al.* 1998 ; LI *et al.* 2003)

Elle est déjà utilisée avec succès chez l'homme, chez qui elle rivalise avec la paromomycine.

La nitazoxanide est absorbée lors d'administration orale et est peu toxique. (MURPHY et FRIEDMANN 1985) La paromomycine est peu toxique également sous réserve que son absorption digestive soit faible. En cas d'affection gastro-intestinale avec altération de la muqueuse digestive, la paromomycine devient potentiellement toxique. (ROASEAU 2003) Par ailleurs, grâce à la séquestration biliaire des métabolites actifs de la nitazoxanide, ce traitement est plus rémanent qu'un traitement « local » à base de paromomycine. (LI *et al.* 2003)

Il sera intéressant de tester l'efficacité et l'innocuité de la nitazoxanide chez les jeunes ruminants en gardant en mémoire la grande variabilité de l'efficacité et de la DL50, observée d'une espèce animale à l'autre.

III.Essai thérapeutique : la nitazoxanide contre la cryptosporidiose du chevreau

L'étude a pour but d'évaluer l'efficacité anticryptosporidienne et la tolérance d'un traitement à base de nitazoxanide, chez des chevreaux infectés expérimentalement par *C. parvum*.

A. Matériel et méthodes

1. Les chevreaux

L'essai a porté sur 47 chevreaux mâles et femelles, de races Alpines et Saanen.

Ces animaux étaient âgés de 24 à 72 heures lors de leur acheminement au Laboratoire d'Études et Recherches Caprines de Niort (LERC).

Tous sont issus d'un même élevage, a priori indemne de cryptosporidiose.

Dans cet élevage d'origine, les chevreaux sont toujours mis à l'allaitement artificiel après que la prise du colostrum ait été constatée, soit dans leurs premières heures de vie. La plupart des animaux utilisés pour l'essai savaient donc boire à la louve.

La veille de leur transport au LERC, tous les chevreaux âgés de 0 à 3 jours (y compris ceux destinés à l'essai), ont reçu une injection d'antibiotique, la spiramycine (SUANOVIL ND) car l'éleveur avait observé quelques diarrhées dans cette classe d'âge. Ce traitement n'est pas susceptible d'interagir avec *C. parvum*.

Les chevreaux n'ont reçu aucun autre traitement avant le début de l'essai. Ils ne présentaient plus de diarrhée ni symptôme notable au moment de leur réception.

2. La prise en charge des animaux à la station

a) Logement

Les chevreaux ont été répartis en trois lots : un lot témoin (16 chevreaux) et deux lots traités à des posologies différentes (15 et 16 chevreaux).

Ces trois lots étaient séparés physiquement pour faciliter l'administration des traitements ; dans trois parcs paillés de 3,5 m².

La paille a été distribuée et accumulée matin et soir de façon à ce que la litière soit toujours sèche.

Une fois par semaine, les parcs ont été entièrement vidés et nettoyés et un asséchant de litière a été appliqué sous la paille.

b)Ambiance

Un système de chauffage assurait une température de 19 °C en permanence dans la chèvrerie.

Un système de ventilation statique garantissait des conditions d'ambiance satisfaisantes.

(Annexe 6 : Plan de la chèvrerie de l'AFSSA site de Niort)

c)Alimentation

Les chevreaux ont été nourris à la louve avec un aliment d'allaitement distribué à volonté. Chaque parc disposait de deux tétines.

3.La molécule testée : la nitazoxanide

a)Médicament utilisé

Le CRYPTASE ND, seul médicament à base de nitazoxanide disponible en France, étant strictement réservé à l'usage hospitalier, les chevreaux ont reçu un médicament vétérinaire importé des Etats-Unis, indiqué pour le traitement de la myéloencéphalite à *Sarcocystis neurona* chez le cheval: NAVIGATOR ND. *(Annexe 7 : Autorisation d'importation et d'utilisation de NAVIGATOR IDDEX, PATE)*

NAVIGATOR ND se présente sous forme de seringues qui contiennent chacune 85 g de d'une pâte orale jaune pâle. Chaque gramme de cette pâte contient 320 mg de nitazoxanide (soit 32 % de nitazoxanide dans le produit).

b)Dose et durée du traitement

Plusieurs essais ont montré l'efficacité dose-dépendante de la nitazoxanide, ses effets secondaires semblent l'être également.

Les nombreux essais thérapeutiques mettant en jeu la nitazoxanide dans des modèles animaux variés n'ont pas permis de déterminer une dose efficace pour traiter la cryptosporidiose.

Chez l'homme, une dose approximative de 15 mg/kg/jour pendant trois jours est retenue tandis que chez le porcelet 125 mg/kg/jour, 11 jours durant, demeurent insuffisants. (THEODOS *et al.* 1998)

Des doses comprises entre 100 et 200 mg/kg/jour pendant 7 jours, sont utilisées à plusieurs reprises chez le rat (LI *et al.* 2003) et la souris (BLAGBURN *et al.* 1998). Elles s'avèrent d'autant plus efficaces sur l'inhibition de l'excrétion d'ookystes que la dose choisie dans cet intervalle est élevée. Aucun signe de toxicité n'est observé lors de ces essais.

Chez le porcelet, le traitement par 250 mg/kg/jour, 11 jours, s'est avéré partiellement efficace mais des diarrhées liées au traitement ont altéré les résultats cliniques. La dose de 125 mg/kg /jour, inefficace, était néanmoins dénuée d'effets secondaires.

Des données concernant des doses intermédiaires ne sont pas disponibles.

L'ensemble de ces observations a conduit à choisir initialement une dose de 200 mg/kg/jour pendant 7 jours pour traiter les chevreaux dans cette expérimentation.

Le traitement dans le lot 1 était préventif et a débuté la veille de d'inoculation des chevreaux.

Le traitement dans le lot 2 devait être à la même dose, mais curatif : dès la détection des premiers ookystes dans les fèces.

Cependant, l'observation de 3 morts suspectes dans les 2 jours suivant l'initiation du traitement dans le lot 1 a conduit à traiter le lot 2 à demi dose et préventivement afin de voir si le traitement était mieux toléré.

En pratique, les chevreaux du lot 2 ont donc reçu 100 mg/kg/jour, préventivement mais avec un décalage de 2,5 jours par rapport au lot 1.

Ces doses étaient disponibles dans respectivement 0,6 et 0,3 g/kg de NAVIGATOR ND.

Les chevreaux ont été pesés régulièrement et la dose qu'ils recevaient était constamment ajustée à leur poids.

c) Rythme d'administration

La nitazoxanide est classiquement administrée en deux à trois prises quotidiennes en raison de la demi-vie plasmatique courte de ses métabolites actifs.

Les chevreaux ont donc été traités matin et soir.

C'est l'efficacité préventive de la nitazoxanide qui a été testée dans cet essai, les traitements ont donc été initiés avant le début de l'excrétion fécale d'ookystes.

4. L'inoculum de *C. parvum*

Les ookystes de *C. parvum* ont été collectés à partir de fèces de chevreaux âgés d'une semaine, infectés naturellement et massivement.

Les ookystes ont ensuite été concentrés et purifiés suivant la méthode utilisée et décrite par LORENZO *et al.* (1993) et rappelée dans l'essai de CASTRO-HERMIDA *et al.* en 2004.

Nous avons mélangé les matières fécales avec une solution de PBS à 0,04 mol/L à pH 7,2 puis nous avons filtré le mélange. (Mailles de 45 µm)

Le filtrat a été additionné de diéthyl-éther dans des proportions 2 :1 et versé dans un tube conique de 50 mL. Le tout a été mixé vigoureusement pendant 30 secondes puis centrifugé 5 minutes à 1000 g.

Quatre phases ont été obtenues. Les trois phases supérieures ont été éliminées. Le sédiment, qui contenait les ookystes, a été récupéré et soumis au précédent traitement jusqu'à ce que toutes ses graisses soient éliminées.

Après plusieurs rinçages, nous avons mis le sédiment en suspension dans 1 mL de PBS puis nous l'avons recouvert de PERCOLL ND.

Nous avons réalisé un gradient de PERCOLL constitué de 4 couches de 2,5 mL chacune et de densités respectives de 1,13 ; 1,09 ; 1,05 et 1,01 g/mL.

Le sédiment recouvert du PERCOLL a été centrifugé à 650g pendant 15 minutes à 4°C. Les ookystes ont ainsi été regroupés dans une bande clairement délimitée entre la couche de densité 1,05 et celle de 1,09 g/mL.

Les ookystes ont été rincés plusieurs fois dans du PBS puis nous les avons mis en suspension dans une solution de dichromate de potassium à 5 %. Nous les avons ensuite conservés à 4°C quelques jours.

Le jour de l'inoculation, nous avons rincé les ookystes trois fois dans du PBS afin d'éliminer le dichromate de potassium.

Le nombre d'ookystes présents dans 1 mL de la suspension obtenue a été déterminé grâce à un hématocytomètre de Neubauer modifié. Pour cela, nous avons préalablement mélangé 0,2 mL de la suspension à 0,8 mL de vert de malachite.

5. Protocole de l'essai

Les chevreaux ont été réceptionnés au LERC le mardi 01 février 2005, « jour 1 » du protocole de l'essai.

Jour 1

- ▶ Trois lots ont été constitués. (*Annexe 8 : composition des 3 lots le 01/02/05*)

Nous avons réparti les animaux en tenant compte de leur âge, poids et sexe, pour assurer la formation de trois lots équivalents.

Le **lot 1** comptait 16 chevreaux. Ce lot a été traité par **200 mg/kg/jour** de nitazoxanide.

Le **lot 2** comptait 15 chevreaux. Ce lot a été traité par **100 mg/kg/jour** de nitazoxanide.

Le **lot 3** (lot **témoin**) comptait 16 chevreaux qui n'ont reçu aucun traitement anti-cryptosporidien.

- ▶ Pesée de tous les chevreaux.

Les chevreaux ont été pesés tous les mardis et jeudis durant l'essai.

- ▶ Initiation du traitement à base de nitazoxanide dans le **lot 1**, le soir
- ▶ Prélèvement de fèces dans le rectum de chaque animal, à l'aide d'une petite curette (bâtonnets double action société Quies Palaiseau France).

- ▶ Examen coproscopique individuel de chacun de ces prélèvements : recherche et quantification des ookystes de *C. parvum*.

Les ookystes de *C. parvum* ont été recherchés au moyen de la méthode de Heine à l'aide d'un microscope à contraste de phase.

L'examen microscopique à l'objectif x10 de chaque prélèvement de fèces, a permis d'attribuer chaque jour un score d'excrétion fécale à chaque chevreau :

0 : absence d'ookyste vu

1 : moins de 1 ookyste par champ,

2 : 1 à 2 ookystes par champ,

3 : 2 à 10 ookystes par champ

4 : plus de 10 ookystes par champ

Des analyses coproscopiques identiques ont été effectuées chaque jour de l'essai (sauf à J20 car les résultats des analyses évoluaient peu en fin d'expérimentation).

Jour 2

Inoculation orale de tous les chevreaux avec un million d'ookystes.

Jour 4

Initiation du traitement à base de nitazoxanide dans le **lot 2**.

Jour 8

Le matin, dernière administration de nitazoxanide dans le lot 1.

Jour 9

Administration de colistine *per os* (COLIPATE ND) à tous les chevreaux suite à l'apparition de « chevreaux mous » l'avant veille. Ce syndrome a été observé sur des chevreaux des trois lots. Ce traitement a été poursuivi sur 3 jours.

Jour 10

Le soir, dernière administration de nitazoxanide dans le lot 2.

Jour 23

Euthanasie de tous les chevreaux après réalisation d'une dernière coproscopie.

6.Outils statistiques

Les résultats ont été analysés avec des tests exacts de Fischer, des tests de khi 2 ou une analyse de variance ANOVA avec le logiciel Systat Ver.9.01 pour Windows.

B.Résultats

Les paramètres étudiés étaient : l'excrétion fécale d'ookystes, la prise de poids et la mortalité.

Le suivi des diarrhées et de l'état général n'a pas pu être interprété suite à cet essai car les chevreaux ont été touchés par une autre maladie diarrhéique. A partir du septième jour, de nombreux chevreaux ont présenté des diarrhées et/ou de l'asthénie : incapacité à se tenir debout, incapacité à téter pour certains, caillette dilatée et atone, et parfois mort. Ces chevreaux mous avaient des scores fécaux très variables. Les trois lots ont été touchés de façon comparable si bien que l'étude du gain de poids et de la mortalité est restée possible. En revanche l'intensité des diarrhées et l'état général sont devenus trop difficiles à évaluer pour être interprétés raisonnablement.

1.L'excrétion fécale d'ookystes

a)Description

Les résultats des coproscopies individuelles quotidiennes figurent en annexe 9. (*Annexe 9 : Scores d'excrétion fécale d'ookystes par jour et par chevreau dans les trois lots*)

Nous observons que tous les chevreaux ont excrété des ookystes sauf un animal du lot 1, qui n'a jamais excrété, et les 6 animaux morts avant que l'excrétion ne débute.

Des courbes d'évolution dans le temps de l'excrétion fécale d'ookystes moyenne ont été établies pour chaque lot. (*Figure 4 ci-après*).

Elles sont construites comme suit :

En abscisses figurent les jours de l'essai. En ordonnées figurent les moyennes quotidiennes des scores d'excrétion des chevreaux du lot. Ces moyennes sont multipliées par cent pour simplifier leur lecture, elles figurent dans le tableau 3 ci-dessous.

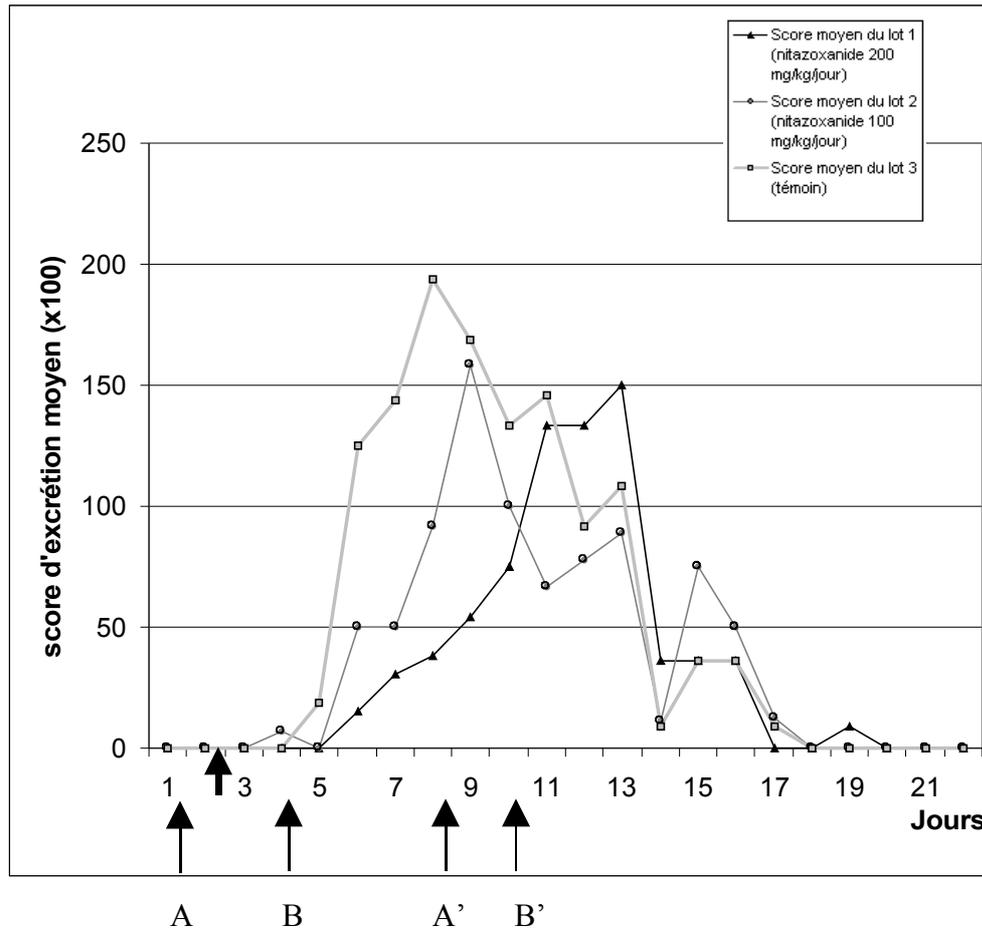
L'utilisation de ces moyennes x 100 (« scores moyens ») permet de comparer l'intensité de l'excrétion d'ookystes dans les 3 lots, bien qu'ils ne comptent pas toujours le même nombre de chevreaux.

Tableau 3 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Moyennes quotidiennes x 100 des scores individuels d'excrétion fécale d'ookystes dans chaque lot de chevreaux

Jours de l'essai	Moyenne des scores du lot 1 x100	Moyenne des scores du lot 2 x100	Moyenne des scores du lot 3 x100
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	7	0
5	0	0	19
6	15	50	125
7	31	50	144
8	38	92	194
9	54	158	169
10	75	100	133
11	133	67	146
12	133	78	92
13	150	89	108
14	36	11	9
15	36	75	36
16	36	50	36
17	0	13	9
18	0	0	0
19	9	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0

Figure 4 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Courbes d'évolution quotidienne des moyennes (x 100) des scores d'excrétion fécale d'ookystes dans chaque lot de chevreaux

Scores 0 : absence d'ookyste vu
 1 : moins de 1 ookyste par champ,
 2 : 1 à 2 ookystes par champ,
 3 : 2 à 10 ookystes par champ
 4 : plus de 10 ookystes par champ



A : début du traitement dans le lot 1
 A' : fin du traitement dans le lot 1
 B : début du traitement dans le lot 2
 B' : fin du traitement dans le lot 2

↑ : Inoculation orale des 3 lots de chevreaux avec un million d'ookystes

Dans le lot témoin, l'excrétion a commencé à J5, et s'est terminée à J18. L'excrétion

d'ookystes moyenne a atteint son maximum 194 à J8.

Dans le lot 2, l'excrétion a débuté à J4, atteint son sommet à J9 avec un score de 158. Elle a cessé à J 18.

Globalement, la courbe des moyennes quotidiennes d'excrétion dans le lot 2 est superposable dans le temps à celle du lot 3. Toutes deux ont une allure en cloche avec un étalement et un sommet qui coïncident.

La courbe du lot 2 est par contre toujours plus basse sur l'axe des ordonnées que la courbe du lot 3 (sauf à J 15, score 75 dans le lot 2, contre 36 dans le lot 3 et à J16 respectivement score de 50 et 36).

Les sommes des scores sur l'ensemble de la période d'excrétion sont d'ailleurs de 848 dans le lot 2 pour 1220 dans le lot témoin.

Dans le lot 1, l'excrétion a commencé à J6, elle a atteint son maximum, score 150 à J13. Elle a pris fin à J21. Elle est décalée dans le temps par rapport à celles observées dans les deux autres lots.

La courbe a une allure en cloche également mais son sommet est plus tardif.

La surface sous cette courbe est proche de la surface sous la courbe du lot 2.

La somme des scores d'excrétion sur l'ensemble de la période est d'ailleurs de 746 dans ce lot (pour 848 dans le lot 2 et 1220 dans le lot témoin).

Entre J12 et J14, l'excrétion dans le lot 1 est supérieure à celle observée dans les autres lots.

Nous avons ensuite calculé la fréquence de chaque score dans l'ensemble des coproscopies de chaque lot. Ces données ont été calculées à partir des résultats figurant en annexe 9. (*Annexe 9 : Scores d'excrétion fécale d'ookystes par jour et par chevreau dans les trois lots*) et figurent dans le tableau 4 et la figure 5 ci-contre.

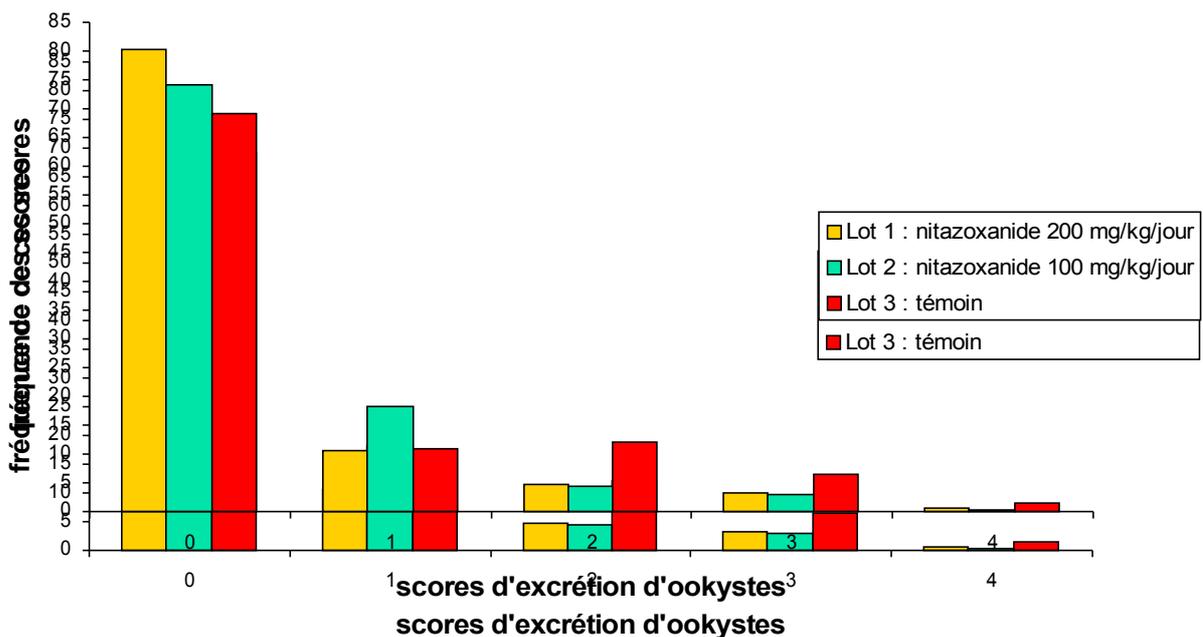
L'objectif était de savoir si, dans chaque lot, l'intensité de l'excrétion globalement observée était due à des excrétions individuelles massives mais intermittentes ou plutôt moins intenses et plus continues.

Tableau 4 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Fréquence de chaque score sur la totalité des coproscopies de l'essai, dans chaque lot

Score	0	1	2	3	4
% Lot 1	80,4	10,7	4,8	3,3	0,7
% Lot 2	74	18,3	4,3	3	0,4
% Lot 3	69,2	10,8	12,2	6,4	1,4

Figure 5 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme de fréquence des scores d'excrétion dans chaque lot de chevreaux

Scores 0 : absence d'ookyste vu
 1 : moins de 1 ookyste par champ,
 2 : 1 à 2 ookystes par champ,
 3 : 2 à 10 ookystes par champ
 4 : plus de 10 ookystes par champ



Il apparaît d'abord que 30,8 % de toutes les coproscopies effectuées, sont positives dans le lot

témoin, contre 26 % dans le lot 2 et 19,6 % dans le lot 1.

Dans le lot témoin, 6,4 % des prélèvements de fèces ont eu la note 3 et 1,4 % ont eu la note 4.

Dans les deux autres lots, seules 3 et 3,3 % des analyses ont eu la note 3 (respectivement pour les lots 1 et 2).

Seules 0,7 et 0,4 % des analyses ont eu la note 4 (respectivement pour les lots 1 et 2).

b)Analyse

Sur l'ensemble de la période, l'excrétion est plus massive dans le lot témoin par rapport aux deux lots traités. Ces différences sont significatives (Test Khi 2, $p= 0,006$ en comparant les lots 1 et 3 ; $p= 0,001$ en comparant les lots 2 et 3)

Il n'y a pas de différence significative pour ce même critère entre les deux lots traités (Test Khi 2, $p= 0,177$)

L'excrétion plus importante dans le lot témoin correspond essentiellement à des scores d'excrétion supérieurs.

On admet que les scores 0, 1 et 2 correspondent à des animaux pas ou peu malades tandis que les notes 3 et 4 accompagnent des symptômes plus sévères.

Il y a significativement plus de notes 3 ou 4 dans le lot témoin par rapport aux lots 1 (Test exact de Fisher, $p= 0,002$) et 2 ($p= 0,032$) entre J6 et J9. Autrement dit, il y a plus de scores fécaux compatibles avec une cryptosporidiose-maladie dans le lot témoin.

Il n'y a pas de différence significative pour ce même critère entre les deux lots traités (test exact de Fisher, $p= 0,352$).

Concernant les lots 1 et 3, l'excrétion globalement plus forte dans le lot 3 s'explique par un deuxième phénomène : il y a significativement plus de coproscopies positives, tous scores confondus, dans le lot témoin. (Test exact de Fisher, $p= 0,003$)

On observe a priori la même chose en comparant les lots 2 et 3 mais la différence n'est pas significative. (Test exact de Fisher, $p= 0,2$)

La période d'excrétion dans le lot 1 est retardée par rapport aux deux autres lots. Entre J6 et J9, il y a significativement plus de coproscopies positives dans le lot 2 par rapport au lot 1. (Test exact de Fisher, $p= 0,001$)

2. Suivi du poids

a) Description

Les résultats des pesées figurent dans les tableaux de l'annexe 10. (*Annexe 10 : Résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids dans les 3 lots*)

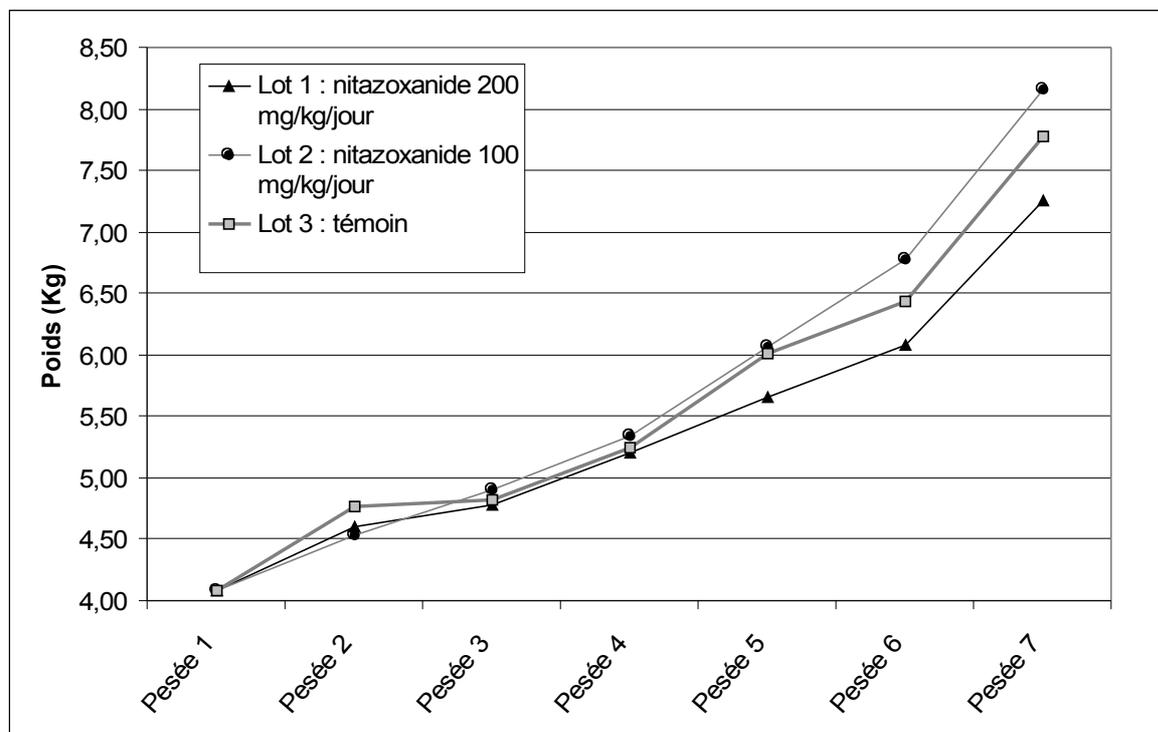
Nous avons calculé le poids moyen des chevreaux de chacun des lots, à chaque pesée. Ces données figurent dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Poids moyen en kg des chevreaux de chaque lot lors de chaque pesée

	Poids (kg) Pesée 1	Poids (kg) Pesée 2	Poids (kg) Pesée 3	Poids (kg) Pesée 4	Poids (kg) Pesée 5	Poids (kg) Pesée 6	Poids (kg) Pesée 7
Lot 1	4,08	4,60	4,78	5,20	5,66	6,08	7,26
Lot 2	4,08	4,54	4,90	5,34	6,07	6,78	8,16
Lot 3	4,08	4,76	4,82	5,24	6,01	6,44	7,77

Nous avons construit les courbes d'évolution du poids moyen dans chaque lot (figure 6) à partir des résultats du tableau 5.

Figure 6 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Courbes d'évolution du poids moyen des chevreaux (en kg) dans chaque lot, entre J1 et J23



A J1, un chevreau pesait moyenne 4,08 Kg, quelque soit son lot.

A J22, le poids moyen était plus élevé dans le lot 2 (8,16 kg) puis dans les lots 3 et 1. (Respectivement 7,77 et 7,26 kg).

Les courbes de croissance sont assez superposables dans chaque lot.

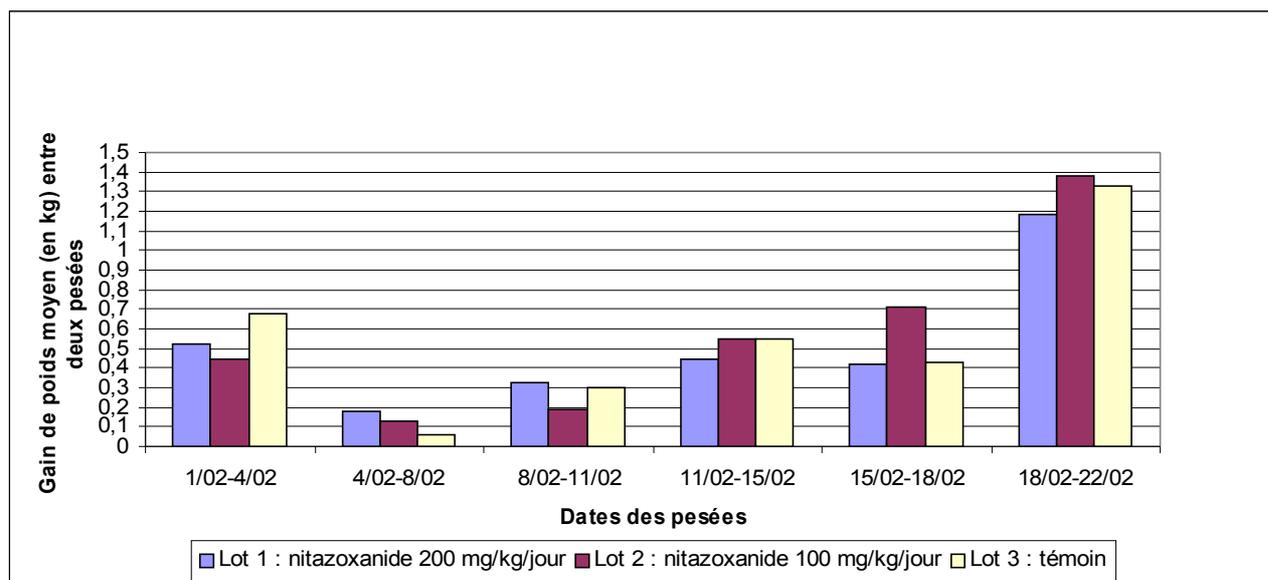
Les trois courbes ont la pente la plus faible entre les pesées 2 et 3.

Pour objectiver ce phénomène nous avons calculé le gain de poids moyen d'un chevreau entre deux pesées, dans chaque lot. Ces résultats figurent dans le tableau 6 ci-contre et sont illustrés par l'histogramme de la figure 7.

Tableau 6 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Gain de poids moyen (en kg) des chevreaux, entre deux pesées, dans les trois lots

Dates des pesées	01/02-04/02	04/02-08/02	08/02-11/02	11/02-15/02	15/02-18/02	18/02-22/02
LOT 1	0,52	0,18	0,33	0,45	0,42	1,18
LOT 2	0,45	0,13	0,19	0,55	0,71	1,38
LOT 3	0,68	0,06	0,3	0,55	0,43	1,33

Figure 7 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme des gains de poids moyens des chevreaux entre deux pesées (en kg) dans les 3 lots



Sur l'histogramme ci-dessus (Figure 7), il faut observer que pour chacun des lots, la période du 4 au 8 février correspond au plus faible gain de poids moyen. Le gain de poids moyen entre deux pesées re-augmente régulièrement à partir de cette date. (Seule une petite baisse est notée pour les lots 1 et 3 entre le 15 et le 18 février, elle est peu marquée comparée à la précédente).

b)Analyse

En comparant la croissance des 3 lots par analyse de la variance (test ANOVA), période par période puis sur l'ensemble de l'essai, on n'obtient aucune différence significative (p toujours $>$ ou $= 0,29$)

Le traitement n'a pas permis d'améliorer la croissance des chevreaux.

3.Suivi de la mortalité

a) Description

(1)Nombre, dates et contextes des morts

Le numéro d'identification des chevreaux morts et la date de leur mort sont répertoriés en annexe 11. (*Annexe 11 : Dates des morts et numéro des chevreaux concernés*)

Les tableaux 7, 8 et 9 ci-dessous et les histogrammes qui en sont issus (figure 8, 9 et 10) permettent de visualiser la répartition des morts dans le temps, lot par lot.

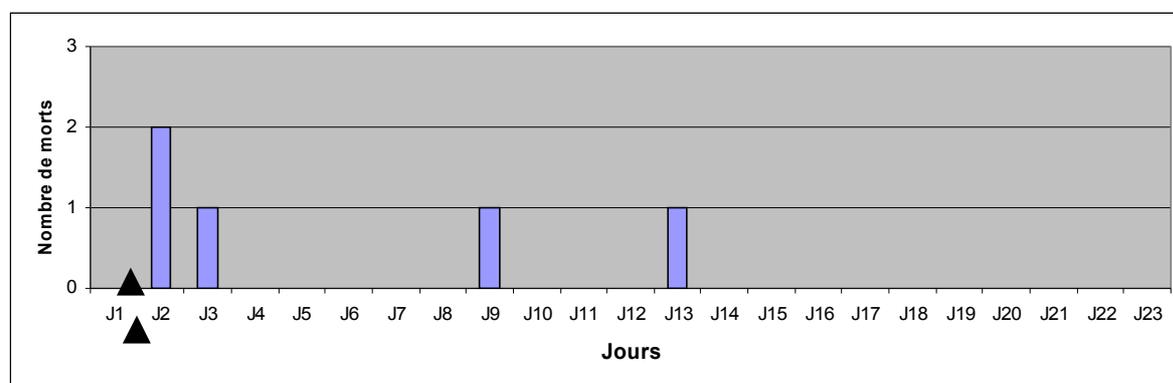
(a) Dans le lot 1

Tableau 7 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Nombre de chevreaux morts dans le lot 1, par jour

Jours de l'essai	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14 à J23
Nombre de morts dans le lot 1	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0

Dans le lot 1, 5 chevreaux (sur 16) sont morts avant les euthanasies de J23. (Tableau 7)

Figure 8 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme de répartition dans le temps des morts du lot 1 traité avec 200 mg/kg/jour de nitazoxanide (NAVIGATOR ND)



Début du traitement ▲

Il y a eu deux vagues de mortalité.

Une première vague suit de près l'initiation du traitement matérialisée par une flèche sur l'axe des abscisses.

La seconde est plus tardive.

Les trois chevreaux morts les 2 et 3 février –deuxième et troisième jour de traitement- sont morts brutalement. Deux d’entre eux ont manifesté des signes de détresse respiratoire d’apparition subite, quelques heures après la seconde administration de nitazoxanide. Ils sont morts en moins d’une heure. Le troisième est mort dans les mêmes conditions après la quatrième administration de nitazoxanide. Toutes les coproscopies de ces chevreaux étaient négatives. (*Cf annexes 9 et 11*)

Les deux autres chevreaux sont morts les 9 et 13 février après que leur état se soit dégradé progressivement : asthénie, diarrhées, anorexie, caillette dilatée et atone puis mort.

Un seul de ces 2 chevreaux (n°4797) a eu une analyse coproscopique très positive (score 3 ou 4) : score 4 l’avant-veille de sa mort. (*Annexes 9 et 11*)

Aucun animal n’est mort après J13.

(b) Dans le lot 2

Tableau 8 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation

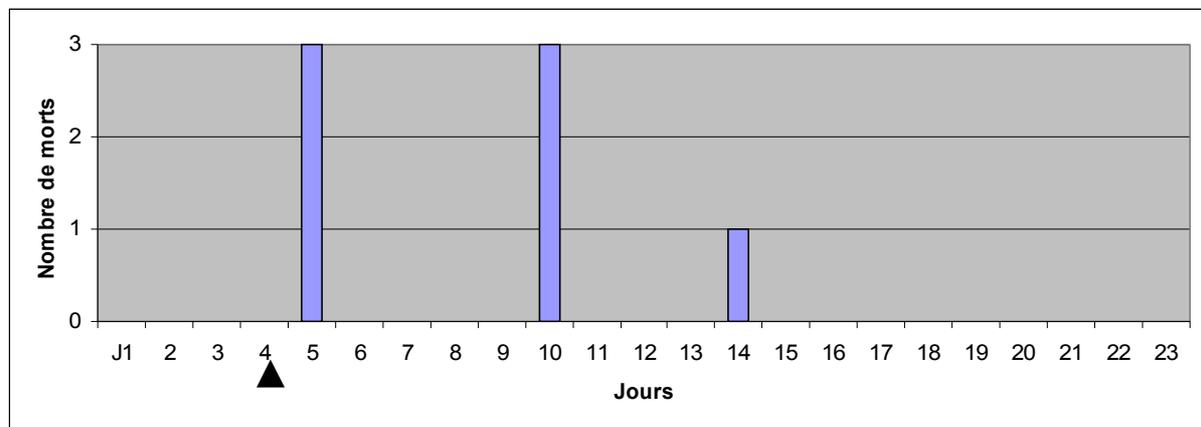
Nombre de chevreaux morts dans le lot 2, par jour

Jours de l'essai	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	j15 à J23
Nombre de morts dans le lot 2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0

Dans le lot 2, 7 (sur 15) chevreaux meurent.

Figure 9 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation

Histogramme de répartition dans le temps des morts du lot 2 traité avec 100 mg/kg/jour de nitazoxanide (NAVIGATOR ND)



Début du traitement ▲



Comme dans le lot 1, il y a eu deux vagues de mortalités et les morts se sont produites dans deux contextes distincts.

Le début du traitement par la nitazoxanide est matérialisé par une flèche noire sur l'axe des abscisses.

Trois chevreaux ont été retrouvés morts le lendemain matin de leur premier traitement, sans prodromes. Ils n'ont reçu que 2 administrations de nitazoxanide. Toutes les coproscopies de ces chevreaux sont négatives. (*Annexes 9 et 11*)

Les quatre autres sont morts plus tard, entre le 10 et le 14 février, après avoir manifesté les symptômes du « cheveau mou ».

Seuls 2 de ces 4 chevreaux ont eu des coproscopies très positives : n°4791 et n°4989 (*Annexes 9 et 11*).

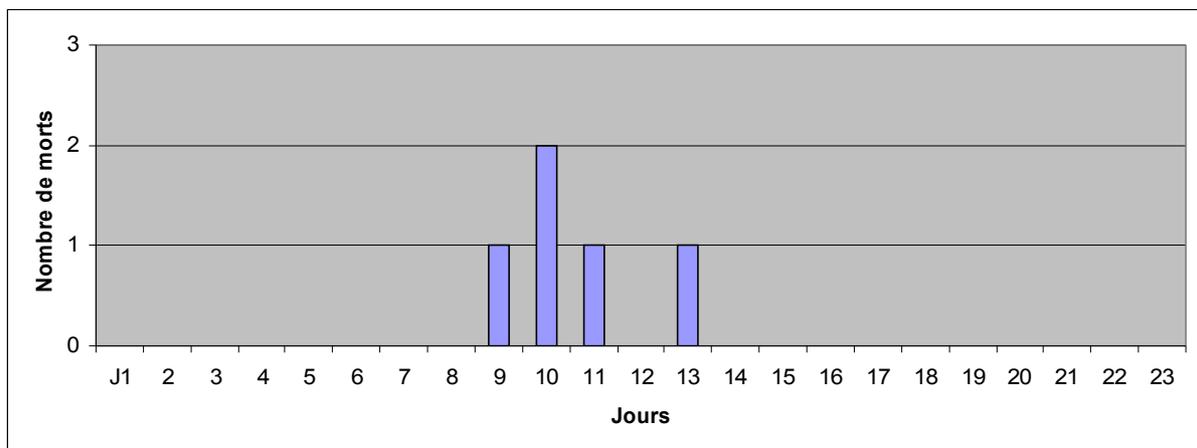
Aucun animal n'est mort après J14.

(c) Dans le lot 3

Tableau 9 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Nombre de chevreaux morts dans le lot 3, par jour

Jours de l'essai	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14 à J23
Nombre de morts dans le lot 3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0

Figure 10 : Essai d'efficacité de la nitazoxanide sur la cryptosporidiose de chevreaux âgés de 0 à 3 jours en début d'expérimentation
Histogramme de répartition dans le temps des morts du lot 3 (lot témoin)



Dans le lot 3, 5 (sur 16) chevreaux sont morts. (Tableau 9)

Ces morts sont groupées du 9 au 13 février. (Figure 10)

Les animaux ont préalablement présenté les symptômes du « chevreau mou ».

Tous ces chevreaux ont eu des coproscopies très positives (*Annexe 9 et 11*).

Aucun animal n'est mort après J13.

(2)Observations nécropsiques, résultats bactériologiques et histologiques

Les chevreaux morts au cours de l'essai ont été systématiquement autopsiés.

Les observations réalisées lors de ces autopsies figurent en annexe 12. (*Annexe 12 : résultats des autopsies et analyses bactériologiques*). Elles sont peu spécifiques.

Sur chacun de ces chevreaux, nous avons réalisé des prélèvements de foie, intestin et poumon, en vue d'une analyse bactériologique réalisée par le LERC. Les résultats de ces analyses figurent également en annexe 12. Ils sont peu concluants.

Des prélèvements de foie, intestin et rein ont été fixés dans du formol à 10 %. Leur analyse histologique faite au LERC n'a révélé aucune lésion spécifique.

b)Analyse

(1)Taux de mortalité global

Le taux de mortalité global diffère selon les lots mais cette différence n'est pas significative. (Test Khi 2 $p= 0,591$ en comparant les trois lots, et test exact de Fisher = $0,753$ en comparant le total des morts traités au total des morts témoins).

Le traitement ne change pas le taux de mortalité global.

(2)Répartition des mortalités

La comparaison du nombre de morts de J1 à J5 parmi les chevreaux traités (6 morts et 25 vivants) avec le nombre de morts pendant cette même période parmi les témoins (0 morts et 16 vivants) ne montre pas de différence significative (Test exact de Fisher $p= 0,0852$).

Les morts précoces observées dans les lots traités n'ont pas de signification statistique.

Toutes les autres morts sont comptabilisées entre J9 et J14, donc pendant l'évolution de la cryptosporidiose. Le nombre de morts à cette période n'est pas significativement différent d'un lot à l'autre. (Test de Khi2, $p= 0,526$)

Toutes les coproscopies de scores 3 ou 4 sont comptabilisées entre J6 et J13.

Pendant la période où la cryptosporidiose pourrait jouer un rôle dans la mortalité, le traitement ne modifie pas significativement le nombre de morts.

(3)Rôle joué par la cryptosporidiose dans la mortalité

On considère que pour un animal qui a au moins une fois un score d'excrétion fécale égal à 3 ou 4, la cryptosporidiose est susceptible de provoquer la mort de cet animal.

Des tests exacts de Fisher ont été réalisés dans les 3 lots et sur différentes périodes. Ces tests sont réalisés sur la base des données figurant dans les tableaux 10, 11 et 12 ci-dessous.

Dans le lot 1 sur toute la durée de l'essai,

Tableau 10 : Base pour le test de Fisher destiné à chercher une influence de la cryptosporidiose sur l'ensemble des mortalités dans le lot 1

Nombre de chevreaux	Pas mort	mort	TOTAL
N'a jamais eu un score d'excrétion >2	4	4	8
A eu au moins une fois un score 3 ou 4	7	1	8
TOTAL	11	5	16

$p=0,282$

La cryptosporidiose n'a pas d'influence sur la mortalité dans le lot 1.

Dans ce lot, 3 chevreaux sont morts avant le début de l'excrétion d'ookystes. Le test est donc renouvelé pour la période de J7 à J23 afin de supprimer l'effet des mortalités précoces, peut être consécutives au traitement.

Tableau 11 : Base pour le test de Fisher destiné à chercher une influence de la cryptosporidiose sur les mortalités de J7 à J23 dans le lot 1

Nombre de chevreaux	Pas mort	mort	TOTAL
N'a jamais eu un score d'excrétion >2	4	1	5
A eu au moins une fois un score 3 ou 4	7	1	8
TOTAL	11	2	13

$p=1$

Les résultats sont comparables pour le lot 2 :

$p=0,608$, de J1 à J23

$p=1$ de J7 à J23

La cryptosporidiose n'a donc aucune influence sur la mortalité dans les lots traités.

Entre J1 et J23, il y a plus de chevreaux morts sans cryptosporidiose que de chevreaux morts

après avoir excrétés des ookystes.

Si on se place après la vague de mortalités précoces, il y a autant de chevreaux morts avec un score ≤ 2 que de chevreaux morts avec au moins un score ≥ 3 .

Dans le lot témoin, entre J1 et J 23,

Tableau 12 : Base pour le test de Fisher destiné à chercher une influence de la cryptosporidiose sur les mortalités dans le lot 3

Nombre de chevreaux	Pas mort	mort	TOTAL
N'a jamais eu un score d'excrétion > 2	4	0	4
A eu au moins une fois un score 3 ou 4	7	5	12
TOTAL	11	5	16

$p= 0,245$

Dans le lot 3, tous les morts ont eu au moins un score d'excrétion ≥ 3 , mais cette observation n'est pas significative.

On ne peut donc pas affirmer que les chevreaux morts pendant l'évolution de la maladie sont morts de cryptosporidiose bien que ces morts coïncident dans le temps avec les analyses très positives.

C. Discussion

1. Le matériel

L'excrétion fécale d'ookystes observée chez la quasi-totalité des chevreaux confirme l'infectiosité de l'inoculat de *C. parvum* utilisé.

Le délai d'apparition de l'excrétion suggère que les chevreaux n'avaient pas été infectés dans leur élevage d'origine.

Le profil d'excrétion obtenu dans le lot témoin est similaire à celui observé lors de cryptosporidiose naturelle.

2. Le protocole

Le protocole a été modifié 3 jours après le début de l'essai, dès que la toxicité de la nitazoxanide à 200 mg/kg/jour a été suspectée. Il a été trouvé plus judicieux d'utiliser le second lot traité pour voir si les chevreaux toléreraient mieux une dose réduite de moitié et si cette dose resterait efficace.

En effet, la posologie de 200 mg/kg/jour avait été déterminée sans la moindre donnée à l'appui (pour les ruminants) et les essais disponibles mettaient en jeu des posologies très variables selon les modèles animaux. Notre choix était donc partiellement arbitraire et un surdosage ne pouvait pas être exclu.

En l'absence de connaissances concernant cette éventuelle toxicité et ses mécanismes chez le chevreau, la réalisation du protocole initialement prévu aurait sans doute apporté des résultats tout aussi intéressants. La tolérance à un traitement dépend souvent de l'âge. Il a été montré par exemple que le lasalocide est très toxique pour les veaux de moins de 7 jours mais que les veaux plus âgés tolèrent quant à eux des doses pouvant aller jusqu'à 15 mg/kg. Le maintien du protocole de base aurait donc permis de savoir si la toxicité suspectée se manifestait aussi sur des chevreaux âgés d'une semaine et si la molécule avait un effet curatif. C'est donc un point qui reste à explorer, même si la toxicité de la nitazoxanide à 200 mg/kg/jour se confirmait chez le chevreau nouveau-né.

Le lot 2 a été traité à demi-dose mais le traitement a été initié 2,5 jours après le traitement du lot 1. Ce décalage rend difficile la comparaison des résultats observés dans les lots 1 et 2. Si des différences significatives avaient été observées entre ces deux lots, il n'aurait pas été possible de conclure à la supériorité d'une posologie par rapport à l'autre.

3. Les résultats de l'essai

Les deux traitements à base de nitazoxanide réduisent de façon similaire l'intensité de l'excrétion fécale d'ookystes. La durée de la période d'excrétion n'est pas modifiée par rapport au lot non traité mais au cours de cette période, les animaux excrètent moins souvent et les scores fécaux relevés sont plus faibles. En tenant compte de la corrélation qui existe entre les scores fécaux et l'intensité de la diarrhée, les précédents résultats laissent penser que la nitazoxanide peut améliorer cliniquement les animaux infectés par *C. parvum*.

Le décalage de la période d'excrétion dans le lot 1 est un phénomène qui a déjà été décrit au cours d'essais impliquant le lactate d'halofuginone ou la paromomycine. Le traitement retarde le développement du parasite.

Ce décalage n'apparaît pas dans le lot 2, traité un peu plus tard et à demi-dose.

Ce décalage observé dans le lot 1 peut représenter un avantage puisqu'on sait que la sensibilité des chevreaux au parasite, décroît avec l'âge. Cet avantage ne peut être clairement objectivé dans cet essai où aucune autre différence significative n'a été observée entre les deux lots traités.

Aucun des deux traitements n'améliore la croissance des chevreaux.

La croissance des animaux est régulière sauf entre le 4 et le 8 février où elle se ralentit (certains chevreaux maigrissent).

Entre ces deux dates, l'excrétion débute dans les trois lots. L'amaigrissement ou l'arrêt de la croissance à ce moment, sont habituels. La diminution du gain de poids moyen à cette période est en accord avec le déroulement de la cryptosporidiose. Elle touche les trois lots de façon comparables (les différences apparentes sur l'histogramme ne sont pas significatives).

Aucun des deux traitements n'améliore le taux de mortalité global.

Le nombre de chevreaux traités, morts entre J1 et J5 n'est pas significatif. La vague de mortalités précoces observée dans les lots traités n'a pas pu être formellement associée au

traitement.

Pourtant, le contexte des morts précoces observées dans les lots 1 et 2 : morts subites, observées dans les lots traités seulement, à la suite des premières administrations de nitazoxanide, peut laisser suspecter une certaine toxicité de la nitazoxanide chez le chevreau.

Le traitement conduit dans le lot 2 (demi-dose et sur des animaux un peu plus âgés que dans le lot 1) n'est pas mieux toléré que celui conduit dans le lot 1.

L'autopsie de ces animaux et l'analyse histologique de leurs principaux organes n'ont rien révélé.

La relation entre les mortalités survenues après J5 (entre J9 et J14) et la cryptosporidiose n'a pas pu être démontrée.

Des syndromes du « chevreau mou » ayant été observés dans les 3 lots entre J7 et J13, cet évènement est susceptible d'expliquer certaines mortalités tardives de l'expérimentation.

4.Hypothèses sur la probable action toxique de la nitazoxanide

Selon Marc GOGNY (professeur en pharmacologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes), la mortalité des premiers chevreaux aurait de fortes chances d'être liée à un découplage de la phosphorylation oxydative. Cette hypothèse s'appuie sur la parenté chimique de la nitazoxanide avec le niclosamide ; des surdosages avec cette dernière molécule entraînant un tel découplage.

Deux facteurs sont de nature à renforcer une toxicité par surdosage chez ces animaux :

- ▶ L'alimentation lactée : la nitazoxanide étant très liposoluble, les matières grasses du lait augmentent fortement la biodisponibilité du médicament donc toute éventuelle toxicité.
- ▶ Le très jeune âge des animaux et donc l'immaturation de leur équipement enzymatique est également susceptible de renforcer la toxicité de la molécule.

Par ailleurs, rappelons que le choix de la posologie était expérimental et que les DL50 connues sont très variables d'une espèce à l'autre.

Un surdosage est donc fortement probable.

En revanche, le découplage de la phosphorylation oxydative s'accompagne classiquement d'une hyperthermie maligne. La plupart des chevreaux morts sont morts brutalement et pendant la nuit, il n'a donc pas été possible de prendre leur température dans les heures précédant leur décès. Nous avons par contre pris la température rectale de deux de ces chevreaux alors qu'ils entraient dans une phase de détresse respiratoire, une heure environ avant leur mort. Nous n'avons pas relevé d'hyperthermie chez ces deux animaux. L'hypothèse d'un découplage de la phosphorylation oxydative ne peut donc pas être renforcée, nous ne pouvons pas l'exclure non plus car la température rectale n'a été mesurée qu'une fois et sur deux chevreaux seulement.

Selon Marc GOGNY, il serait utile à l'avenir de tester la nitazoxanide à une dose très inférieure pour voir si l'efficacité constatée dans notre essai se maintient et si l'action toxique s'estompe.

IV. Conclusion

La nitazoxanide administrée préventivement à raison de 200 mg/kg/jour ou 100 mg/kg/jour pendant 7 jours, a réduit significativement l'intensité de l'excrétion fécale d'ookystes de chevreaux infectés expérimentalement par *C. parvum*. L'excrétion fécale d'ookystes a ainsi été réduite de 30,5 % dans le lot 2 et 39 % dans le lot 1, par rapport au lot témoin.

Le poids et le taux de mortalité ne sont en revanche pas modifiés.

Une toxicité aiguë de la nitazoxanide a été suspectée et devra être confirmée et précisée au cours d'autres essais si les résultats obtenus ici en terme d'efficacité sont jugés suffisamment intéressants.

L'efficacité préventive de la nitazoxanide telle qu'elle apparaît dans cet essai, ne semble pas supérieure à celle de molécules déjà utilisées ; le lactate d'halofuginone et la paromomycine, elles, susceptibles de réduire le taux de mortalité. (JOHNSON 2000, CHARTIER 1996, HOECHST ROUSSEL VET 2000)

Si la nitazoxanide devait faire l'objet de nouveaux essais thérapeutiques chez le chevreau (dans l'hypothèse où sa toxicité ne se confirmerait pas), il pourrait être intéressant de tester son efficacité en curatif. Cette molécule a en effet donné quelques résultats partiellement satisfaisants lors d'essais curatifs dans d'autres modèles animaux et on sait que les molécules connues pour le moment sont très décevantes dans ce contexte.

Dans tous les cas, le précédent essai ne laisse pas beaucoup d'espoir quand à l'intérêt de la molécule dans le traitement préventif de la cryptosporidiose du chevreau. C'est un essai qui devait pourtant être fait puisque les résultats obtenus dans d'autres modèles animaux et chez l'homme étaient assez prometteurs.

Les informations apportées par la biologie moléculaire permettent de préciser les origines phylogéniques de *C. parvum*. FAYER (2004), cite pour exemple la récente découverte de STRIEPEN *et al.* (2002) selon laquelle l'enzyme inosine 5-monophosphate-déhydrogénase de *C. parvum*, présente d'importantes similitudes avec celle de *Helicobacter pylori*. De telles informations devraient ouvrir de nouvelles pistes pour la recherche thérapeutique. (FAYER 2004)

Les résultats obtenus récemment avec les cyclodextrines sont prometteurs et devraient encourager de prochains essais.

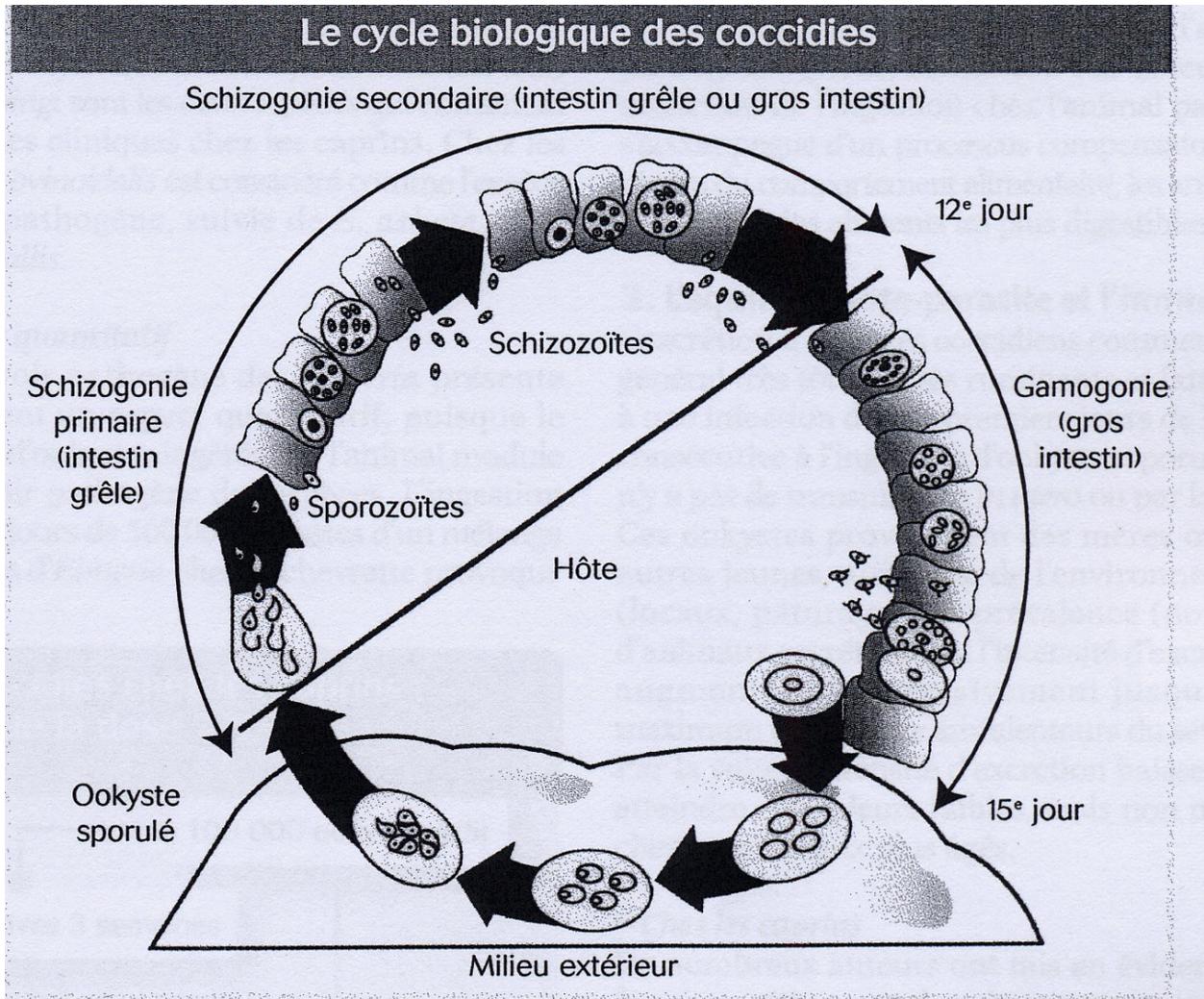
En attendant, le lactate d'halofuginone et le sulfate de paromomycine restent les deux

molécules de choix pour lutter médicalement contre la cryptosporidiose du chevreau mais la paromomycine n'est toujours pas utilisable légalement en France.

ANNEXES

Annexe 2 : cycle d'*Eimériidés*

(CHARTIER 2002b)



Annexe 3 : méthode de Ziehl-Neelsen modifiée

(ANONYME 2001, CHAMBON 1990)

- ▶ Etaler les matières fécales sur une lame
- ▶ Sécher à l'air
- ▶ Fixer à l'éthanol à 95° pendant 5 minutes
- ▶ Flamber la lame
- ▶ Recouvrir la lame encore chaude de fuchsine de Ziehl
- ▶ Attendre 5 minutes et rincer à l'eau du robinet
- ▶ Décolorer rapidement avec 1 ou 2 giclées d'une solution d'acide chlorhydrique à 3 % dans de l'éthanol à 95°
- ▶ Rincer à l'eau
- ▶ Recouvrir la lame à l'aide de bleu de méthylène de 0,1 à 0,3 % pendant 1 minute
- ▶ Rincer à l'eau du robinet puis sécher
- ▶ Mettre de l'huile à immersion et observer à l'objectif x40 ou 100

Les ookystes apparaissent rouges sur fond bleu.

Annexe 4 : méthode de Heine

(ANONYME 2001, CHAMBON 1990)

- ▶ Déposer une goutte de fuchsine de Ziehl sur une lame
- ▶ Mélanger avec une goutte de matière fécale
- ▶ Faire un étalement mince
- ▶ Laisser sécher à l'air
- ▶ Dès que le prélèvement est sec (d'aspect mat), ajouter l'huile à immersion puis la lamelle
- ▶ Observer à l'objectif x 40 ou 100 de préférence avec un contraste de phase

Les ookystes apparaissent brillants sur un fond rouge et plus sombre.

Annexe 5 : méthode de flottaison au saccharose

(ANONYME 2001, CHAMBON 1990)

- ▶ Déposer une goutte de solution saturée de saccharose sur une lame (sirop de sucre de canne ou 50 grammes de sucre dans 32 millilitres d'eau)
- ▶ Mélanger avec une goutte de matière fécale
- ▶ Recouvrir d'une lamelle
- ▶ Observer immédiatement au microscope à l'objectif x25, 40 ou 100.

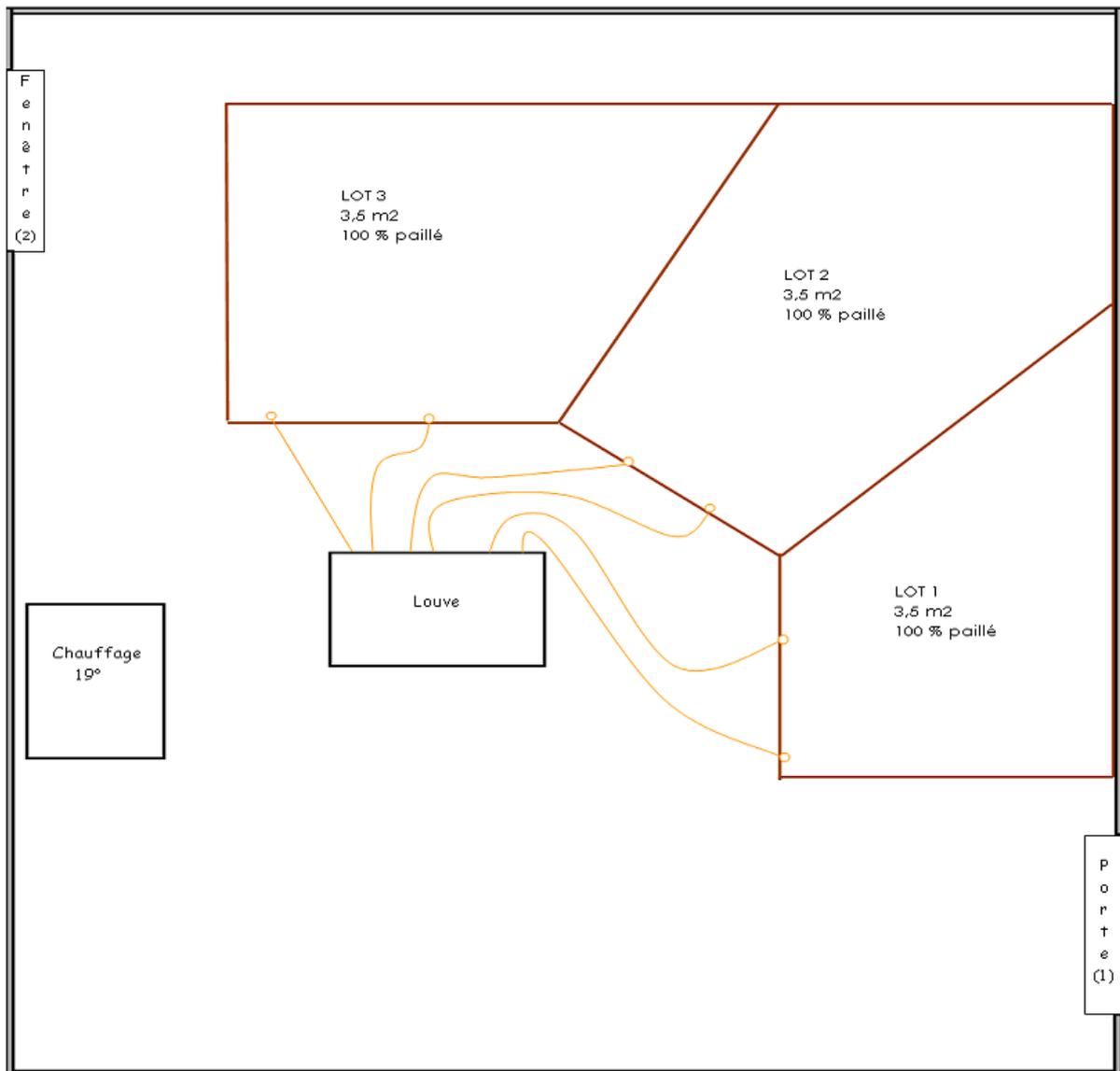
Les ookystes remontent à la surface par différentiel de densité.

Ils apparaissent rosés à l'objectif x5, légèrement rosés au x40, réfringents et contenant 1 à 4 granulations sombres au x100.

Une quantification est possible par comptage des ookystes en cellule de Thoma. (CHARTIER C., *et al.* 2002)

La lecture doit se faire immédiatement après la préparation de la lame et suppose un œil averti.

Annexe 6 : Plan de la chèvrerie de l'AFSSA site de Niort



Légende :

- tétines
- tuyaux à lait en caoutchouc
- (1) porte d'entrée, entre ouverte, entrée d'air
- (2) fenêtre en hauteur, entre ouverte, sortie d'air

Les lots de chevreux sont séparés entre eux et du reste de la pièce, par des planches en bois de 1 mètre de hauteur

**Annexe 7 : autorisation d'importation et d'utilisation de
NAVIGATOR IDDEX, PATE**



Agence nationale du médicament vétérinaire
BP 90203
35302 Fougères cedex

Tél : 02 99 94 78 60
Télécopie : 02 99 94 78 64

République Française

AFSSA NIORT

N°

AUTORISATION D'IMPORTATION ET D'UTILISATION

AUTO n° 04_216

LE DIRECTEUR GENERAL DE L'AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS,

Vu le Code de la Santé Publique, notamment ses articles L. 5142-2, L. 5142-7 et R. 5141-123,

Vu la demande d'importation, à des fins d'étude thérapeutique vis à vis de la cryptosporidiose du chevreau dans l'établissement AFSSA, SITE DE NIORT, LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES CAPRINES, 60 RUE PIED DE FOND, BP 3081, 79012 NIORT CEDEX, présentée le 28/10/2004 pour le médicament NAVIGATOR IDDEX par Monsieur Christophe CHARTIER et les compléments d'information présentés le 05/11/2004,

Considérant que l'établissement AFSSA, SITE DE NIORT, LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES CAPRINES, 60 RUE PIED DE FOND, BP 3081, 79012 NIORT CEDEX, bénéficie, depuis le 23/04/2004, d'un agrément pour la réalisation d'expériences sur les animaux vertébrés vivants sous le N° A 79-003,

Considérant que Monsieur Christophe CHARTIER est autorisé depuis le 19/04/2004 à réaliser des expériences sur animaux vertébrés vivants (autorisation n° 79-002),

DECIDE :

ARTICLE 1. - L'établissement AFSSA, SITE DE NIORT, LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES CAPRINES, 60 RUE PIED DE FOND, BP 3081, 79012 NIORT CEDEX est autorisé à importer le médicament vétérinaire dénommé :

NAVIGATOR IDDEX, PATE

dont la composition qualitative et quantitative en principe actif est :

- . Nitazoxanide..... 32 %
- . Excipient QSP 85 g de pâte

et en provenance de : IDDEX, ETATS UNIS.

ARTICLE 2. - Les quantités importées sont de :

- . 10 seringues.

ARTICLE 3. - Les responsabilités pharmaceutiques inhérentes à l'importation du médicament vétérinaire mentionné à l'article 1 de la présente décision ainsi qu'à l'élimination des excédents selon la législation en vigueur sur les déchets sont assurées par Monsieur Christophe CHARTIER, AFSSA, SITE DE NIORT, LABORATOIRE D'ETUDES ET DE RECHERCHES CAPRINES, 60 RUE PIED DE FOND, BP 3081, 79012 NIORT CEDEX.



Annexe 8 (1/3) : Composition (numéros, âges, sexes, poids) des 3 lots de chevreaux le 01/02/2005

Lot 1 :

NUMÉRO	AGE jours	SEXE	POIDS Kg
4753	1	M	2,90
4999	1	M	4,30
4967	1	F	4,05
4981	2	M	3,35
4992	2	M	4,70
4983	2	M	5,20
4987	2	M	4,30
4993	2	F	4,15
4800	3	M	2,60
4784	3	M	4,50
4777	3	F	3,85
4792	3	M	4,95
4793	3	M	3,70
4788	3	M	4,40
4782	3	M	4,35
4797	3	M	4,05
Moyennes	2,31	13 mâles et 3 femelles	4,08

Annexe 8 (2/3) : Composition (numéros, âges, sexes, poids) des 3 lots de chevreaux le 01/02/2005

Lot 2 :

NUMÉRO	AGE jours	SEXE	POIDS Kg
4970	1	F	2,95
4997	1	M	3,90
4767	1	M	4,95
4984	2	M	4,55
4995	2	M	5,35
4986	2	M	4,50
4989	2	F	3,40
4994	2	F	4,00
4764	3	M	2,95
4791	3	M	3,10
4969	3	F	3,50
4790	3	M	5,25
4785	3	M	3,95
4961	3	M	4,60
4766	3	M	4,30
Moyennes	2,27	11 mâles et 4 femelles	4,08

Annexe 8 (3/3) : Composition (numéros, âges, sexes, poids) des 3 lots de chevreaux le 01/02/2005

Lot 3 :

NUMÉRO	AGE jours	SEXE	POIDS Kg
4769	3	M	3,60
4783	3	M	4,60
4789	3	M	4,55
4794	3	M	4,90
4795	3	M	4,00
4796	3	M	4,20
4799	2	F	2,15
4968	3	F	3,40
4982	3	F	4,50
4985	2	M	4,00
4988	2	M	5,30
4990	2	M	4,30
4991	2	M	4,75
4996	1	M	4,30
4998	1	F	2,70
5000	1	M	4,10
Moyennes	2,31	12 mâles et 4 femelles	4,08

Annexe 9 (1/3) : scores d'excrétion fécale d'ookystes par jour et par chevreau dans les trois lots

Dans le lot 1 :

		Jours des copro. :																								
		J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	21	22	23		
score d'excrétion individuel	chevreau																									
	4753	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0															
	4777	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4782	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4784	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4788	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	3	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4792	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4793	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	4797	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	1	0												
	4800	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4967	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4981	0	0	0																						
	4983	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4987	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	3	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4992	0	0																							
	4993	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4999	0	0																							
		somme des scores	0	0	0	0	0	2	4	5	7	9	16	16	18	4	4	4	0	0	1	0	0	0	0	0

Les scores figurant en grand caractère sont ceux des chevreaux morts dans la journée.

Annexe 9 (2/3) : scores d'excrétion fécale d'ookystes par jour et par chevreau dans les trois lots

Dans le lot 2 :

	Jours des copro. :																						
	J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	21	22	23
chevreau																							
4764	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4766	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4767	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4785	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0													
4790	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4791	0	0	0	0	0	1	1	1	4	3													
4961	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4969	0	0	0	0	0																		
4970	0	0	0	0	0																		
4984	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
4986	0	0	0	0	0																		
4989	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	3	0									
4994	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4995	0	0	0	0	0	2	0	1	2	3	0	1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
4997	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1													
Somme des scores	0	0	0	1	0	6	6	11	19	12	6	7	8	1	6	4	1	0	0	0	0	0	0

Les scores figurant en grand caractère sont ceux des chevreaux morts dans la journée.

Annexe 9 (3/3) : scores d'excrétion fécale d'ookystes par jour et par chevreau dans les trois lots

Dans le lot 3 :

	Jours des copro. :																							
	J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
chevreau																								
4769	0	0	0	0	0	1	2	2	2	3	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4783	0	0	0	0	0	2	2	2	3	3	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4789	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4														
4794	0	0	0	0	0	0	2	2	3	2	1	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4795	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4796	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4799	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	3	0	1											
4968	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4982	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4985	0	0	0	0	1	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4988	0	0	0	0	0	3	0	2	3	1	2	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4990	0	0	0	0	0	0	3	3	1	1	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4991	0	0	0	0	1	2	2	4	2	2														
4996	0	0	0	0	1	3	3	2	2	2	3													
4998	0	0	0	0	0	3	2	3	4															
5000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somme des scores	0	0	0	0	3	20	23	31	27	20	19	11	13	1	4	4	1	0						

Les scores figurant en grand caractère sont ceux des chevreaux morts dans la journée

Annexe 10 (1/3): résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids dans le lot 1

Annexe 10 (1/3) : résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids P en kg dans le lot 1

Date des pesées	P 1/02	Variation	P 4/02	Variation	P 8/02	Variation	P 11/02	Variation	P 15/02	Variation	P 18/02	Variation	P 22/02
chevreaux													
4753	2,9	0,65	3,55	0,05	3,6		mont 9/02						
4777	3,85	0,45	4,3	0,45	4,75	0,6	5,35	0,85	6,2	0,6	6,8	1,1	7,9
4782	4,35	0,8	5,15	0,55	5,7	0,65	6,35	1,2	7,55	0,5	8,05	1,45	9,5
4784	4,5	0,35	4,85	0,75	5,6	0,15	5,75	0	5,75	0,1	5,85	1,5	7,35
4788	4,4	0,75	5,15	0,45	5,6	0,25	5,65	0,3	6,15	-0,25	5,9	1,2	7,1
4792	4,95	0,7	5,65	-0,25	5,4	0,65	6,05	0,95	7	0,75	7,75	0,95	8,7
4793	3,7	0,4	4,1	0,55	4,65	0,3	4,95	0,65	5,6	0,6	6,2	0,9	7,1
4797	4,05	0,8	4,85	0,3	5,15	0,05	5,2		mont 13/02				
4800	2,6	0,4	3	-0,2	2,8	-0,05	2,75	0,05	2,8	0,1	2,9	0,65	3,55
4867	4,05	0,25	4,3	-0,2	4,1	0,1	4,2	0,55	4,75	-0,4	4,35	1,45	5,8
4981	3,35		mont 3/02										
4983	5,2	0,5	5,7	-0,65	5,05	0,6	5,65	0,2	5,85	1,05	6,9	1,1	8
4987	4,3	1	5,3	-0,1	5,2	0,35	5,55	0,15	5,7	0,6	6,3	1,8	8,1
4992	4,7		mont 2/02										
4993	4,15	-0,25	3,9	0,65	4,55	0,25	4,8	0,1	4,9	1	5,9	0,85	6,75
4999	4,3		mont 2/02										
somme	65,35	6,8	59,8	2,35	62,15	3,9	62,45	5	62,25	4,65	66,9	12,95	79,85
nombre de vivants	16	13	13	13	13	12	12	11	11	11	11	11	11
poids moyen	4,08		4,6		4,78		5,2		5,66		6,08		7,26
gain de poids moyen des survivants		0,52		0,18		0,33		0,45		0,42		1,18	

Annexe 10 (2/3): résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids dans le lot 2

Annexe 10 (2/3) : résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids P en kg dans le lot 2

Date des pesées	P 1/02	Variation	P 4/02	Variation	P 8/02	Variation	P 11/02	Variation	P 15/02	Variation	P 18/02	Variation	P 22/02
chevreaux													
4764	2,96	0,3	3,25	-0,4	2,85	0,1	2,95	0,1	3,05	0	3,05	0,5	3,55
4766	4,3	0,9	5,2	0,65	5,85	0,5	6,35	0,6	6,95	0,05	7	1,8	8,8
4767	4,95	0,65	5,6	0,1	5,7	0,4	6,1	0,2	6,3	0,95	7,25	1,45	8,7
4785	3,95	0,3	4,25	-0,15	4,1		mort 10/02						
4790	5,25	0,85	6,1	0,4	6,5	0,5	7	0,7	7,7	0,95	8,65	1,75	10,4
4791	3,1	1,2	4,3	0,15	4,45		mort 10/02						
4961	4,6	0,35	4,95	0,15	5,1	0,45	5,55	0,75	6,3	1	7,3	1,3	8,6
4969	3,5	0,5	4		mort 5/02								
4970	2,95	-0,1	2,85		mort 5/02								
4984	4,55	0,75	5,3	0,5	5,8	0,05	5,85	0,2	6,05	1,05	7,1	1,4	8,5
4986	4,5	-0,45	4,05		mort 5/02								
4989	3,4	0,6	4	0	4	-0,1	3,9	0	mort 13/02				
4994	4	0,25	4,25	-0,25	4	0,15	4,15	0,7	4,85	0,75	5,6	1,4	7
4995	5,35	0,6	5,95	0,55	6,5	-0,3	6,2	1,15	7,35	0,9	8,25	1,45	9,7
4997	3,9	0,1	4	-0,1	3,9	0	mort 10/02						
somme	61,25	6,8	68,05	1,6	58,75	1,75	48,05	4,4	48,55	5,65	54,2	11,05	65,25
nombre de vivants	15	15	15	12	12	9	9	8	8	8	8	8	8
poids moyen	4,08		4,54		4,9		5,34		6,07		6,78		8,16
gain de poids moyen des survivants		0,45		0,13		0,19		0,55		0,71		1,38	

Annexe 10 (3/3) : résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids dans le lot 3

Annexe 10 (3/3) : résultats des pesées quotidiennes et suivi du poids P en kg dans le lot 3

Date des pesées	P 1/02	Variation	P 4/02	Variation	P 8/02	Variation	P 11/02	Variation	P 15/02	Variation	P 18/02	Variation	P 22/02
chevreaux													
4769	3,6	0,7	4,3	0,36	4,65	0,95	5,6	0,7	6,3	0,2	6,5	1,3	7,8
4783	4,6	0,65	5,25	-0,1	5,15	0,7	5,85	0,85	6,7	0,65	7,35	1,35	8,7
4789	4,55	0,75	5,3	0,1	5,4		mort 10/02						
4794	4,9	0,95	5,75	0,5	6,25	-0,45	5,8	0,5	6,3	0,45	6,75	1,3	8,05
4795	4	0,9	4,9	0,36	5,25	0,15	5,4	0,7	6,1	0,55	6,65	0,4	7,05
4796	4,2	1,4	5,6	0,4	6	0,5	6,5	0,6	7,1	0,35	7,45	1,6	9,05
4799	2,15	0,4	2,55	-0,15	2,4	0,35	2,75		mort 13/02				
4868	3,4	0,2	3,6	0,2	3,8	0,15	3,95	0,35	4,3	0,05	4,35	1,05	5,4
4882	4,5	1,4	5,9	0,2	6,1	0,9	7	0,9	7,9	0,6	8,5	1,8	10,3
4885	4	0,2	4,2	0,2	4,4	-0,1	4,3	0,05	4,35	0,95	5,3	1,35	6,65
4888	5,3	0,4	5,7	0,1	5,8	-0,25	5,55	0,85	6,4	0,4	6,8	1,7	8,5
4890	4,3	0,55	4,85	-0,05	4,8	0,2	5	0,1	5,1	0,05	5,15	1,35	6,5
4891	4,75	0,95	5,7	-1,1	4,6		mort 10/02						
4896	4,3	0,6	4,9	-0,05	4,85		mort 10/02						
4898	2,7	0,5	3,2	-0,15	3,05		mort 09/02						
5000	4,1	0,35	4,45	0,2	4,65	0,5	5,15	0,45	5,6	0,45	6,05	1,4	7,45
somme	65,36	10,8	76,15	1	77,15	3,6	62,85	6,05	66,15	4,7	70,85	14,6	85,45
nombre de vivants	16	16	16	16	16	12	12	11	11	11	11	11	11
poids moyen	4,08		4,76		4,82		5,24		6,01		6,44		7,77
gain de poids moyen des survivants		0,68		0,06		0,3		0,55		0,43		1,33	

Annexe 11 : Dates des morts et numéros des chevreaux concernés

Lot 1 :

NUMÉRO	DATE MORT
4753	09-févr
4777	
4782	
4784	
4788	
4792	
4793	
4797	13-févr
4800	
4967	
4981	03-févr
4983	
4987	
4992	02-févr
4993	
4999	02-févr
Total des morts	5

Lot 2 :

NUMÉRO	DATE MORT
4764	
4766	
4767	
4785	10-févr
4790	
4791	10-févr
4961	
4969	05-févr
4970	05-févr
4984	
4986	05-févr
4989	14-févr
4994	
4995	
4997	10-févr
Total des morts	7

Lot 3 :

NUMÉRO	DATE MORT
4789	
4783	10-févr
4789	
4794	
4795	
4796	13-févr
4799	
4968	
4982	
4985	
4988	
4990	10-févr
4991	11-févr
4996	09-févr
4998	
5000	
Total des morts	5

Annexe 12 : résultats des autopsies et analyses bactériologiques

Numéro de boucle du chevreau (Lot)	Résultats de l'analyse bactériologique sur foie	Résultats de l'analyse bactériologique sur intestin	Résultats de l'analyse bactériologique sur poumon	Symptômes observés au cours de la vie de l'animal	Résultats de l'examen nécropsique
4992 (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Aeromonas hydrophile</i>	Détresse respiratoire et Jetage incolore ≈1h avant la mort	Congestion sur un lobe pulmonaire diaphragmatique Congestion hémorragique de l'intestin Foie de couleur hétérogène : zones décolorées et zones congestives
4999 (1)	<i>Aeromonas hydrophile</i>	-	-	Détresse respiratoire ≈1h avant la mort	Pas de lésion macroscopique
4981 (1)	-	<i>E. Coli</i>	-	Détresse respiratoire ≈1h avant la mort	Congestion foie, cœur, reins, uretères, et environ 50 cm d'intestin
4986 (2)	<i>E. coli</i>	-	-	Aucun	Congestion foie, reins et cœur
4969 (2)	<i>E. coli</i>	-	-	Aucun	Congestion foie, reins, congestion légère du caecum
4970 (2)	<i>E. coli</i>	-	-	Aucun	Pas de lésion, sauf quelques traces d'hémorragie dans la caillette
4753 (1)	-	<i>E. coli</i>	-	Légère parésie postérieure congénitale	Foie décoloré et dégénéré, friable Poumons légèrement congestionnés Reins : hémorragie dans la corticale, décapsulation anormalement facile Cœurs : pétéchies sur ventricules Tube digestif normal

4998 (3)	-	<i>E. coli</i>	-	Diarrhée, légèrement hémorragique la veille de la mort	Caillette dilatée Congestion intestinale Caecum dilaté Diarrhée abondante de couleur jaune d'or dans la partie terminale du tube digestif (caecum et colon)
4997 (2)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	-	« Mou » depuis la veille	Dilatation de la caillette, avec une muqueuse noire sur la moitié de sa surface (côté pylore) Contenu brun-noir de tout le tube digestif Congestion de la masse intestinale, caecum dilaté
4991 (3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	-	Depuis 4 jours : abattement et diarrhée jaune, couché depuis deux jours	Dilatation de la caillette, avec une muqueuse noire sur la moitié de sa surface (côté pylore) Tube digestif congestionné sur toute sa longueur, muqueuse par endroits hémorragique Caecum dilaté Contenu du tube digestif liquide et noirâtre dans sa moitié proximale, puis liquide et jaune dans sa partie distale
4789 (3)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	-	« Mou » depuis la veille	Légère congestion des reins et de la masse intestinale Dilatation de la caillette Contenu du tube digestif liquide et grisâtre
4785 (2)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	« Mou » depuis deux jours	Légère dilatation de la caillette Dans le caecum : contenu pâteux avec un peu de sang
4791 (2)	-	<i>E. coli</i>	-	« Mou » et très diarrhéique la veille	Rien sauf dilatation du caecum, avec un contenu très liquide et de couleur jaune d'or, de même que le contenu du colon
4996 (3)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	-	Abattement depuis 2 ou 3 jours	Caillette un peu dilatée Intestin légèrement congestionné, avec un contenu vert sombre Caecum dilaté, contenu gris pâle (comme dans le colon)
4799 (3)	<i>E. coli</i> <i>Proteus</i>	<i>E. coli</i>	-	Abattu et diarrhée modérée depuis plusieurs jours	Pas de lésion macroscopique Contenu du tube digestif diarrhéique, jaune dans le caecum, blanchâtre dans le rectum
4797 (1)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	-	Abattu depuis plusieurs jours	Pas de lésions macroscopiques notables Caillette un peu dilatée Excréments jaunes pâteux
4989	<i>Proteus</i>	-	-	Abattu	Pas de lésion

(2)				depuis environ 5 jours	Excréments jaune vif
-----	--	--	--	------------------------------	----------------------

Références bibliographiques

- 1) ANONYME (2001), *Diagnostiquer la cryptosporidiose* [cd-rom], Intervet. 
- 2) ANONYME (2002), Product Information : Alinia, Nitazoxanide. Romark Pharmaceuticals, Tampa, FL.
- 3) ANONYME (2005a) ROMARK LABORATORIES, *Site des laboratoires ROMARK*, [en ligne], Mise à jour en mars 2005, [<http://www.romarklabs.com>], (consulté le 24 mars 2005).
- 4) ANONYME (2005b), BIO VETO TEST, *Site de la société BVT*, [en ligne], mis à jour le 05 septembre 2005, [<http://www.bvt.fr>], consulté le 05 septembre 2005.
- 5) ANONYME (2005c), EXOPOL, *Site de la société EXOPOL*, [en ligne], mis à jour en mai 2005, [<http://www.exopol.fr>], consulté le 05 septembre 2005.
- 6) APPELBEE  J., THOMPSON R.C.A., OLSON  E., (2005), *Giardia and Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs, *Trends in Parasitology*, **21** (8), 370-376.
- 7) ARMITAGE K., FLANIGAN T., CAREY J., FRANK I., MACGREGOR R.R., ROSS P., GOODGAME R., TURNER J., (1992), Treatment of cryptosporidiosis with paromomycin, *Archives of internal medicine*, **12**, 2497-2499.
- 8) BLAGBURN B.L, DRAIN K.L, LAND T.M, KINARD R.G, HUTTON- MOORE P.H, LINDSAY D.S, PATRICK D.A, BOYKIN D.W, TIDWELL R.R, (1998), Comparative efficacy evaluation of dicationic carbazole compounds, nitazoxanide and paromomycin against *C. parvum* infections in a neonatal mouse model, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42** (11), 2877-2882.
- 9) BENSON J.E., ENSLEY S.M., CARSON T.L., HALBUR P.G., JANKE B.H., QUINN W.J., (1998), Lasalocid toxicosis in neonatal calves, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **10**, 210-214.
- 10) CASEMORE D.P., (1991), Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis, *Journal of clinical pathology*, **44**, 445-451.

- 11) CASTRO-HERMIDA J.A, FREIRE-SANTOS F., OTEIZA-LOPEZ A.M., ARES-MAZAS E., (2000a), Unexpected activity of β -cyclodextrin against experimental infection by *Cryptosporidium parvum*, *Journal of Parasitology*, **114**, 1118-1120.
- 12) CASTRO-HERMIDA J.A, FREIRE-SANTOS F., OTEIZA-LOPEZ A.M., VERGARA CASTIBLANCO C.A., ARES-MAZAS E., (2000b), *In vitro* and *in vivo* efficacy of lasalocid for treatment of experimental cryptosporidiosis, *Veterinary Parasitology*, **90**, 265-270.
- 13) CASTRO-HERMIDA J.A, QUILEZ-CINCA J., LOPEZ-BERNAD F., SANCHEZ.ACEDO C., FREIRE-SANTOS F., ARES-MAZAS E., (2001a), Treatment with β -cyclodextrin of natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs under field conditions, *International Journal for Parasitology*, **31**, 1134-1137.
- 14) CASTRO-HERMIDA J.A, GONZALEZ-LOSADA Y., FREIRE-SANTOS F., MEZO-MENENDEZ M., ARES-MAZAS E., (2001b), Evaluation of β -cyclodextrin against natural infections of cryptosporidiosis in calves, *Veterinary Parasitology*, **101**, 85-89.
- 15) CASTRO-HERMIDA J.A, ARES-MAZAS E., (2003), *In vitro* and *in vivo* efficacy of α -cyclodextrin for treatment of experimental cryptosporidiosis, *Veterinary Parasitology*, **114**, 237-245.
- 16) CASTRO-HERMIDA J.A, PORS I., OTERO-ESPINAR F., LUZARDO-ALVAREZ A., ARES-MAZAS E., CHARTIER C., (2004), Efficacy of α -cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal goats, *Veterinary Parasitology*, **120**, 35-41.
- 17) CASTRO-HERMIDA J.A., DELAFOSSE A., PORS I., ARES-MAZAS E., CHARTIER C., (2005), *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids, *Veterinary record*, **157**, XXX-XXX.
- 18) CHAMBON F (1990) *La cryptosporidiose du chevreau enquête et essai thérapeutique*, Thès.Méd.Vét., Nantes, 145 p.
- 19) CHARTIER C., MALLEREAU M.P, NACIRI M., (1996), Prophylaxis using paromomycin of natural cryptosporidial infection in neonatal kids, *Preventive veterinary medicine*, **25**, 357-361.
- 20) CHARTIER C., MALLEREAU M.P., LENFANT D., (1999), Efficacité du lactate d'halofuginone dans la prévention de la cryptosporidiose chez le chevreau nouveau-né, *Revue de Médecine Vétérinaire*, **150**, 341-348.

- 21) CHARTIER C., (1999)  Epidémiologie et contrôle de la cryptosporidiose chez le veau, *In : Journées européennes organisées par la Société Française de Buiatrie*, Paris, 20-21-22 Octobre, 181-190.
- 22) CHARTIER C., (2001a), Epidémiologie de la cryptosporidiose *Le point vétérinaire* n°212, 2-6.
- 23) CHARTIER C., (2001b), Contrôle de la cryptosporidiose des ruminants *Le point vétérinaire*, n° 213, 32-35.
- 24) CHARTIER C., (2002a), La cryptosporidiose des petits ruminants, *Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine*, 118-122.
- 25) CHARTIER C. (2002b) La coccidiose des petits ruminants, *Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine*, 112-117.
- 26) CHARTIER C., MALLEREAU-PELLET M.P., MANCASSOLA R., NUSSBAUM D., (2002), Détection des ookystes de *Cryptosporidium* dans les fèces de caprins : comparaison entre un test d'agglutination au latex et trois autres techniques conventionnelles, *Veterinary research*, **33** (2), 169-177.
- 27) CLEZY K., GOLD J., BLAZE J., JONES P., (1991), Paromomycin for the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients, *AIDS*, **5** (9), 1140-1141.
- 28) DELAFOSSE A., CASTRO-HERMIDA J.A., BAUDRY C., PORS I., ARES-MAZAS M., CHARTIER C. , (2003), Prévalence et facteurs de risque de la cryptosporidiose caprine dans le département des Deux Sèvres, *10èmes Rencontres Recherches Ruminants*, 289-292.
- 29) DUBEY J.P., SPEER C.A., FAYER R., (1990), *Cryptosporidiosis of man and animals*, Boston : Raton et Arbor, 199 p.
- 30) FAYER R., (2004), *Cryptosporidium*, a water-borne zoonotic parasite, *Veterinary Parasitology*, **126**, 37-56.
- 31) FAYER R., ANDREWS C., UNGAR B.L.P., BLAGBURN B., (1989), Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves, *Journal of Parasitology*, **75** (3), 393-397.
- 32) FAYER R., JENKINS M.C., BOSTWICK E., ELLIS W., (1993), Control of cryptosporidiosis : new immuno and chemotherapies, *In : 14th International Conference of the W.A.A.V.P.*, Cambridge, U.K., 8-13th August 1993, 1010-1011.

- 33) FAYER R., ELLIS W., (1993), Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves, *Journal of Parasitology*, **79** (5), 771-774.
- 34) FICHTENBAUM C.J., RITCHIE D.J., POWDERLY W.G., (1993), Use of paromomycin for treatment of cryptosporidiosis in patients with AIDS, *Clinical infectious diseases*, **16**, 298-300.
- 35) GOBEL E., (1987), Diagnose und Therapie der akuten Kryptosporidiose beim Kalb, *Tierärztliche Umschau*, **42**, 863-869.
- 36) GOODGAME R.W., GENTA R.M., WHITE A.C., CHAPPELL C.L., (1993), Intensity of infection in AIDS associated cryptosporidiosis, *The Journal of Infectious Diseases*, **167**, 704-709.
- 37) GREENBERG P.D., CELLO J.P., (1996), Treatment of severe diarrhea caused by *C. parvum* with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS, *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrom and Human Retrovirology*, **13**, 348-354.
- 38) GRINBERG A., MARKOVICS A., GALINDEZ J., LOPEZ-VILLALOBOS N., KOSAK A., TRANQUILLO V.M., (2002), Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate, *The Veterinary Record*, **16**, 606-608.
- 39) GUILLET J.P., (2005) Contre la cryptosporidiose du veau, il n'y a pas le choix, *La semaine vétérinaire* n° 1169, p34.
- 40) HARP J.A., GOFF J.P., (1998), Strategies for the control of *C. parvum* infection in calves, *Journal of Dairy Science*, **81**, 289-294.
- 41) HAMMEL P., ROGEAUX O., DIOUF M.L., GOUYON B., RUSZ-NIEWSKI P., BERNADES P., (1992), Efficacité du sulfate de paromomycine (Humagel ®) chez un malade atteint de sida avec cryptosporidiose intestinale, *Gastroentérologie clinique et biologique*, **16**, 1010-1011.
- 42) HOECHST ROUSSEL VET (2000), HALOCUR 0,5 mg/mL solution buvable l'innovation dans la prévention de la diarrhée à *C. parvum*, Preferendum 854 197.
- 43) JENKINS M.C., O'BRIEN C., TROUT J., GUIDRY A., FAYER R., (1998), Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *C. parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice, *Vaccine*, **17**, 2453-2460.

- 44) JOHNSON E.H, WINDSOR J.J, MUIRHEAD D.E, KING G.J, AL-BUSAIDY A, (2000), Confirmation of the prophylactic value of paromomycin in a natural outbreak of caprine cryptosporidiosis, *Veterinary Research Communications*, **24**, 63-67.
- 45) JOHNSON D., (1992), Lasalocid (Bovatec) toxicity in neonatal calves, *DVM news*, **6**, 5.
- 46) LEFAY D., NACIRI M., POIRIER P., CHERMETTE R., (2001), Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves, *The veterinary record*, **148**, 108-112.
- 47) Le GUILLOU S., (2002), La cryptosporidiose des petits ruminants, *Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine*, p 122.
- 48) LINDSAY D.S., WOODS K.M., UPTON S.T., BLAGBURN B.L., (2000), Activity of decoquinate against *Cryptosporidium parvum* in cell cultures and neonatal mice, *Veterinary Parasitology*, **89**, 307-311.
- 49) LI X, BRASSEUR P., AGNAMEY P., LEMEITEL D., FAVENNEC L., BALLEST J.J., ROSSIGNOL J.F., (2003), Long lasting anticryptosporidial activity of nitazoxanide in an immunosuppressed rat model, *Folia Parasitologica*, **50**, 19-22.
- 50) MANCASSOLA R., REPERANT J.M., NACIRI M., CHARTIER C., (1994), Chemoprophylaxis of *C. parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **39** (1), 75-78.
- 51) MANCASSOLA R., RICHARD A., NACIRI M., (1997), Evaluation of decoquinate to treat experimental cryptosporidiosis in kids, *Veterinary Parasitology*, **69**, 31-37.
- 52) MARSHALL R.J., FLANIGAN T.P., (1992), Paromomycin inhibits *C. Parvum* infection of a human enterocyte cell line, *The Journal of Infectious Diseases*, **165**, 772-774.
- 53) MATTEWS J., (1991), *Diseases of the goat*, Oxford : Butterworth-Heinemann, 310 p.
- 54) McKELLAR Q., LAWRENCE K., (1996), Potential Toxicities : Ionophores, *In Practice*, **9**, 385-386.
- 55) MILLEMANN Y., ADJOU K., MAILLARD R., POLACK B., CHARTIER C., (2003), Les diarrhées néonatales des agneaux et des chevreaux, *Le point vétérinaire n°233*, 22-29.
- 56) MOLINA J.M., RODRIGUEZ-PONCE E., FERRER O., GUTIERREZ A.C., HERNANDEZ S., (1994), Biopathological data of goat kids with cryptosporidiosis, *The Veterinary Record*, **135** (3), 67-68.

- 57) MOORE D.A., ATWILL E.R., KIRK J.H., BRAHMBHATT D., ALONSO L.H., HOU L., SINGER M.D., MILLER T.D., (2003), Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **223**, 839-845.
- 58) MOON H., WOODE G., AHRENS F., (1982), Attempted chemoprophylaxis of cryptosporidiosis in calves, *The Veterinary Record*, **110**, 181.
- 59) MURPHY J.R., FRIEDMANN J.C., (1985), Pre-clinical toxicology of nitazoxanide, a new antiparasitic compound, *Journal of applied toxicology*, **5** (2), 49-52.
- 60) MUSNIER L., (2004), Cryptosporidiose : viser la mère pour protéger le jeune, *Activeto* n°29, p17.
- 61) NACIRI M., YVORE P., (1989), Efficacité du lactate d'halofuginone dans le traitement de la cryptosporidiose chez l'agneau, *Recueil de médecine vétérinaire*, **165**, 823-826.
- 62) NACIRI M., (1994), La cryptosporidiose, *Le point vétérinaire spécial Ruminants et Santé Publique*, **26**, 49-55.
- 63) NACIRI M., MANCASSOLA R., REPERANT J.M., CANIVEZ O., QUINQUE B., YVORE P., (1994), Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum, *Veterinary Parasitology*, **53**, 173-190.
- 64) NACIRI M., LEFAY M.P., MANCASSOLA R., HOUGRON M., POLY L., CHERMETTE R., (1999), Efficacité d'une nouvelle formulation du lactate d'halofuginone sur la cryptosporidiose du veau nouveau-né, *Sixièmes Rencontres Recherche Ruminants*, 183-183.
- 65) NOORDEEN F., HORADAGODA N.U., FAIZAL A.C., RAJAPAKSE R.P., RAZAK M.A., ARULKANTHAN A., (2002), Infectivity of *C. parvum* isolated from adult goats to mice and goat kids, *Veterinary Parasitology*, **103** (3), 217-225.
- 66) PERRYMAN L.E., KAPIL S.J., JONES M.L., HUNT E.L., (1999), Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *C. parvum* recombinant protein, *Vaccine*, **17**, 2142-2149.
- 67) POLACK B., CHERMETTE R., SAVEY M., BUSSIERAS J., (1983), Les cryptosporidies en France, Techniques usuelles d'identification et résultats préliminaires d'enquêtes épidémiologiques, *Le point vétérinaire*, **15**, 41-45.
- 68) PONCELET J.L., (2003), La cryptosporidiose des agneaux, *Pâtre*, n° 507.

- 69) PONGS P., (1989), Kryptosporidien-Infektion beim Kalb Behandlungsversuch mit Lasalocid-Na unter Praxis-bedingungen, *Tierarzliche Umschau*, **44**, 100-101.
- 70) RADOSTIS O., GAY C., BLOOD D., HINCHCLIFF K., (2000), Cryptosporidiosis, *Veterinary medicine* 9th ed. 1310-1313.
- 71) REDMAN D.R., FOX J.E., (1994), The effect of varying levels of DECCOX® on experimental cryptosporidia infections in holstein bull calves, *The bovine proceedings*, 157-159.
- 72) ROASEAU M., (2003), Drug monograph ALINIA *Heritage Information Systems Inc.*
- 73) ROSSIGNOL J.F., AYOUB A., AYERS M.S., (2001), Treatment of diarrhea caused by *C. Parvum* : a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide, *The Journal of Infectious diseases*, **184**, 103-106.
- 74) SAGODIRA S., BUZONI-GATEL D., IOCHMANN S., NACIRI M., BOUT D., (1999), Protection of kids against *C. parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA, *Vaccine*, **17**, 2346-2355.
- 75) SALMON H., (1999), Colostrum et immunité passive du jeune ruminant, *In : Société française de buiatrie*, Paris, France, les 20, 21, 22 octobre 1999, 202-210.
- 76) SMITH C.M., SHERMAN D.M., (1994), *Goat medicine*, Philadelphie : Lea et Febiger, 620 p.
- 77) STOCKIS A., ALLEMON A.M., DE BRUYN S., (2002), Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man using single ascending oral doses, *Internal Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutic*, **40**, 213-220.
- 78) THEODOS C.M., GRIFFITHS J.K., D'ONFRO J., FAIRFIELD A., TZIPORI S., (1998), Efficacy of Nitazoxanide against *C. parvum* in cell culture and in animals models, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42** (8), 1959-1965.
- 79) TZIPORI S., ROBERTON D., CHAPMAN C., (1986), Remission of diarrhea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum, *British Journal of Medecine*, **293**, 1276-1277.
- 80) VERDON R., RENE E., (1993), La diarrhée chez le sujet infecté par le VIH, *La Revue du Praticien- Médecine Générale*, **7** (231), 59-65.

- 81) VILLACORTA I., PEETERS J.E., VANOPDENBOSCH E., ARES-MAZAS E., THEYS H., (1991), Efficacy of halofuginone lactate against *C. parvum* in calves, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35** (2), 283-287.
- 82) WATERS W.R., REINHARDT T.A., HARP J.A., (1997), Oral administration of putrescine inhibits *C. parvum* infection of neonatal C57BL-6 mice and is independent of nitric oxide synthesis, *International Journal for Parasitology*, **83** (4), 746-750.
- 83) Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires (2003) 12^{ème} édition, Maisons-Alfort : Editions du Point Vétérinaire.
- 84) Dictionnaire VIDAL (1991) 60^{ème} édition, Paris : Editions du VIDAL.