



HAL
open science

Étude du portage digestif de parasites opportunistes chez l'enfant dénutri à Madagascar

Guillaume Roux

► **To cite this version:**

Guillaume Roux. Étude du portage digestif de parasites opportunistes chez l'enfant dénutri à Madagascar. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-01103919

HAL Id: dumas-01103919

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01103919>

Submitted on 15 Jan 2015

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2013

N°

**Etude du portage digestif de parasites opportunistes chez
l'enfant dénutri à Madagascar**

Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale
Conformément aux dispositions du décret N°90-180 du 10 Septembre 1990 tient lieu de

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ETAT

Guillaume ROUX
Né le 24 Septembre 1986, à Apt (84).

Thèse soutenue publiquement à la faculté de Pharmacie de Grenoble*
le 12 Novembre 2013

Devant le Jury composé de

Président du jury : Madame le Professeur Murielle CORNET

Membres : Monsieur le Docteur Ronan JAMBOU (directeur de thèse)
Monsieur le Professeur Hervé PELLOUX
Monsieur le Docteur Olivier EPAULARD
Madame le Docteur Delphine ALDEBERT

** La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation
aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs
auteurs*

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2012-2013

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Abcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Muriel	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotecnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEUR EMERITE (n=1)

GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)
----------------	-------	--

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotecnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)

Dernière mise à jour : 17/07/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)
MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRACTICIEN HOSPITALIER (n=3)		
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)
PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)		
FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

Dernière mise à jour : 17/07/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
DON	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
----------	---------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

SUEUR	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
VAN NOOLEN	Laëticia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

ATER (n= 6)

DAYDE David	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
FAVIER Mathieu	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
HADDAD-AMAMOU Anis	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
HENRI Marion	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
REGENT-KLOEKNER Myriam	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
LE CERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse et Ontogénèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 17/07/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

REMERCIEMENTS

Au professeur Muriel Cornet, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse et partagé sa passion de la parasitologie-mycologie.

Au docteur Ronan Jambou, de m'avoir accueilli à l'Institut Pasteur de Madagascar et permis de mener ce travail avec une grande liberté.

Au professeur Hervé Pelloux, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, soutenu et conseillé à toutes les étapes de l'internat.

Au docteur Delphine Aldebert, pour ses conseils avisés avant mon départ à Madagascar et pour accepter de siéger dans ce jury de thèse

Au docteur Olivier Epaulard, d'avoir accepté de juger ce travail éloigné des préoccupations quotidiennes des infectiologues en France.

A la Fondation Pierre Ledoux-Jeunesse Internationale, de m'avoir attribué une bourse me permettant de finaliser sereinement ce travail à l'Institut à l'Institut Pasteur de Madagascar.

A la Division International de l'Institut Pasteur, de m'avoir financé mon voyage en avion jusqu'à Madagascar.

Au professeur Patrice Morand, de m'avoir accueilli dans son laboratoire de virologie tout en me permettant d'achever cette thèse d'exercice.

Au personnel et stagiaires de l'unité d'immunologie de l'Institut Pasteur de Madagascar, pour leur accueil, leur bonne humeur et leur soutien tout au long de ce travail, particulièrement à Emma Rakotomalala, Sandrine Soloniando, Fabiola Gosinary et Sarah Delshadi.

Au docteur Rindra Randremanana de l'unité d'épidémiologie de l'Institut Pasteur de Madagascar pour la mise à disposition de ces données et prélèvements de l'étude de cohorte « Campylobacter ».

A Sébastien Bailly, pour son expertise statistique, sa disponibilité et la clarté de ses réponses face à mes interrogations.

A tout le personnel du département des agents infectieux, biologistes, techniciens, pour m'avoir fait partager leurs connaissances en infectiologie et pour leurs attentions au quotidien.

A toutes les personnes travaillant à l'Institut Pasteur de Madagascar, des gardiens aux directeurs, de m'avoir accueilli avec bienveillance et accordé leur amitié.

A ma famille, qui m'a tout donné et a supporté mon éloignement prolongé en terres malgaches.

A mes amis, avec qui j'ai partagé des moments forts et qui m'ont soutenu dans les moments difficiles.

A tous les personnes non mentionnées ici qui m'ont donné leur affection.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	9
INTRODUCTION	13
Partie 1: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	14
1.1. Les cryptosporidies	15
1.1.1. Généralités.....	15
1.1.2. Cycle des cryptosporidies	16
1.1.3. Mode de contamination.....	18
1.1.4. Epidémiologie des cryptosporidies.....	18
1.1.5. Pouvoir pathogène des cryptosporidies	19
1.1.6. Diagnostic de la cryptosporidiose	20
1.1.7. Traitement de la cryptosporidiose	22
1.2. <i>Isospora belli</i>	23
1.2.1. Généralités.....	23
1.2.2. Cycle d' <i>Isospora belli</i>	23
1.2.3. Mode de contamination.....	24
1.2.4. Epidémiologie d' <i>Isospora belli</i>	25
1.2.5. Pouvoir pathogène d' <i>Isospora belli</i>	25
1.2.6. Diagnostic de l'isosporose	26
1.2.7. Traitement de l'isosporose	27
1.3. <i>Cyclospora cayetanensis</i>	27
1.3.1. Généralités.....	27
1.3.2. Cycle et mode de contamination.....	27
1.3.3. Epidémiologie de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	29
1.3.4. Pouvoir pathogène de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	30
1.3.5. Diagnostic et traitement de la cyclosporose.....	30
1.4. Les microsporidies.....	31
1.4.1. Généralités.....	31
1.4.2. Cycle et mode de contamination.....	32
1.4.3. Epidémiologie des microsporidies.....	34
1.4.4. Pouvoir pathogène des microsporidies	35
1.4.5. Diagnostic des microsporidioses intestinales.....	36
1.4.6. Traitement des microsporidioses intestinales	37

1.5.	Dénutrition, immunodépression et diarrhées	38
1.5.1.	Généralités.....	38
1.5.2.	Diagnostic de la dénutrition chez l'enfant de moins de cinq ans.....	38
1.5.3.	Dénutritions et conséquences chez l'enfant.....	41
1.5.4.	L'immunodépression secondaire à la dénutrition	42
1.5.1.	Dénutrition- diarrhées- immunodépression	43
1.5.5.	Dénutrition et diarrhées de l'enfant à Madagascar.....	45
Partie 2:	MATERIEL ET METHODES	46
2.1.	Démarche expérimentale générale.....	47
2.2.	Etude rétrospective « Opportunistes Moramanga »	50
2.2.1.	Objectifs de l'étude	50
2.2.2.	Population étudiée	50
2.2.3.	Etude de cohorte « <i>Campylobacter</i> »	50
2.2.4.	Sélection des sujets pour l'étude « Opportunistes Moramanga »	51
2.2.5.	Analyses parasitologiques	53
2.2.6.	Analyses statistiques	53
2.3.	Etude prospective « Opportunistes Tsaralalana »	54
2.3.1.	Objectifs de l'étude	54
2.3.2.	Lieu de l'étude.....	55
2.3.3.	Inclusion des sujets.....	55
2.3.4.	Analyses parasitologiques	56
2.3.5.	Analyses statistiques	57
2.4.	Analyses parasitologiques.....	57
2.4.1.	Analyses microscopiques	57
2.4.2.	Biologie Moléculaire.....	58
2.4.2.1.	Extraction d'ADN.....	58
2.4.2.2.	Mise au point d'une qPCR Taqman® <i>Isospora</i> - <i>Cyclospora</i>	59
2.4.2.3.	Diagnostic d'espèce des cryptosporidies	61
Partie 3:	RESULTATS	63
3.1.	Etude « Opportunistes Moramanga »	64
3.1.1.	Description générale de l'échantillon	64
3.1.2.	Description du portage digestif de parasites opportunistes.....	66
3.1.3.	Facteurs associés au portage de parasites opportunistes.....	67

3.1.4.	Facteurs associés au portage de microsporidies	72
3.2.	Etude « Opportunistes Tsaralalana »	75
3.2.1.	Description générale de l'échantillon	75
3.2.2.	Fréquences de portage de parasites intestinaux	76
3.2.3.	Etude du portage de levure	78
3.2.4.	Etude du portage de parasites opportunistes	78
Partie 4 :	DISCUSSION	79
4.1.	Considérations expérimentales	80
4.2.	Etude « Opportunistes Moramanga »	84
4.2.1.	Fréquence des portages parasitaires	84
4.2.2.	Facteurs nutritionnels	86
4.2.3.	Facteurs environnementaux	88
4.2.3.1.	Usage de latrines	88
4.2.3.2.	Savon et sol insalubre	89
4.2.3.3.	Saison des pluies	90
4.2.3.4.	L'hypothèse d'un réservoir animal	91
4.3.	Etude « Opportunistes Tsaralalana »	93
4.3.1.	Portage digestif de levures	94
4.3.2.	Portage de parasites opportunistes	95
4.3.3.	Malnutrition aiguë et immunodépression	98
4.3.4.	Malnutrition aiguë et flore digestive	98
4.4.	Perspectives	99
CONCLUSION	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	117

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Critères d'exclusion des prélèvements de l'étude cas-témoin rétrospective.....	52
Tableau II: Amorces et sondes de la PCR Taqman® duplex <i>Isospora-Cyclospora</i>	60
Tableau III: Amorces et sondes de la PCR nichée cryptosporidies pour le diagnostic d'espèce.	62
Tableau IV: Caractéristiques statistiques des données anthropométriques des sujets de l'étude « Opportunistes Moramanga ».	65
Tableau V: Résultats détaillés des analyses microscopiques des prélèvements de l'étude « Opportunistes Moramanga ».	67
Tableau VI: Comparaisons des paramètres anthropométriques et socio-démographiques entre les sujets porteurs de PO et non porteurs de PO.	68
Tableau VII: Résultats de l'analyse par régression logistique des paramètres anthropométriques et environnementaux sur le portage de parasites opportunistes dans l'étude « Opportunistes Moramanga ».	71
Tableau VIII: Résultats de l'analyse par régression logistique des facteurs associés à un risque de portage de microsporidies dans l'étude « Opportunistes Moramanga ».	74
Tableau IX: Caractéristiques cliniques des cas de MAS de l'étude « Opportunistes.....	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Arbre phylogénétique basé sur les séquences de la petite sous-unité ribosomale des 28 espèces de cryptosporidies officiellement caractérisées.	15
Figure 2: Cycle reproductif de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	17
Figure 3: Oocystes de <i>Cryptosporidium</i> spp. colorés au Ziehl-Neelsen, observés au x1000 ..	21
Figure 4: Cycle reproductif d' <i>I. belli</i>	24
Figure 5: Oocystes d' <i>I. belli</i> observés au microscope à l'état frais.....	26
Figure 6: Cycle reproductif de <i>C. cayetanensis</i>	28
Figure 7: Oocystes de <i>C. cayetanensis</i> observés au microscope à l'état frais.....	31
Figure 8: Cycle reproductif des microsporidies (d'après le site Internet du CDC).....	33
Figure 9: Microsporidies colorées par la technique de Weber.	36
Figure 10: Démarche diagnostique de la malnutrition chronique chez l'enfant de moins de 60 mois, selon les critères de l'OMS et de l'UNICEF.	39
Figure 11: Démarche diagnostique de la malnutrition aiguë chez l'enfant de moins de 60 mois, selon les critères de l'OMS et de l'UNICEF.	40
Figure 12: Le cercle vicieux de la malnutrition et des infections digestives.	44
Figure 13: Démarche expérimentale générale des études épidémiologiques sur le portage des parasites opportunistes lancées par l'Institut Pasteur de Madagascar.	49
Figure 14: Organigramme du processus d'exclusion de prélèvements de l'étude « Opportunistes Moramanga ».	64
Figure 15: Motifs d'hospitalisation au CRENI des enfants de l'étude « Opportunistes Tsaralalana ».	75
Figure 16: Résultats des analyses parasitologiques des selles de l'étude « Opportunistes Tsaralalana ».	77

LISTES DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BET: Bromure d'ETHidium

BLAST: Basic Local Aligement Searching Tool

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CRENI : Centre de Récupération et d'Education Nutritionnelles Intensives

dNTP : désoxyNucléotide TriPhosphate

EIA : Enzyme ImmunoAssay

ET : écart-type

HLA : Human Leucocyte Antigen

IgA : Immunoglobuline d'isotype A

IFD: ImmunoFluorescence Directe

IMC : Indice de Masse Corporelle

ITS: Internal Transcribed Spacer

MAS: Malnutrition Aiguë Sévère

MC : Malnutrition Chronique

MgCl₂: Chlorure de Magnésium

MIF: Merthiolate-Iode-Formol

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONG : Organisation(s) Non Gouvernementale(s)

OR : Odd Ratio

PB : Périmètre Brachial

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PO : Parasite(s) Opportuniste(s)

PVPP : PolyVinylPolyPirrolidone

qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SD : Standard Deviation ou écart-type

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

UV : UltraViolet (rayonnement)

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

La malnutrition et la diarrhée de l'enfant sont des enjeux de santé publique à Madagascar. La malnutrition pouvant être considérée comme une cause d'immunodépression, elle favoriserait l'émergence de pathogènes opportunistes lors de diarrhées infectieuses. Partant de ce postulat, nous nous sommes intéressés à certains parasites et champignons responsables d'infections digestives sévères chez les patients atteints du SIDA, cause d'immunodépression plus largement étudiée. Ces parasites (cryptosporidies, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*) et champignons parasites (microsporidies) n'ont été ni recherchés ni étudiés à Madagascar. La présence de certains n'a même pas été confirmée dans ce pays.

Le but de ce travail était donc de mettre en place à l'Institut Pasteur de Madagascar des outils diagnostiques pour la pratique clinique et à des fins de recherche pour ces pathogènes intestinaux, ainsi que de démarrer des études sur le portage digestif. A ce sujet deux études préliminaires chez l'enfant dénutri ont été réalisées, l'une rétrospective communautaire en milieu rural, l'autre prospective en milieu hospitalier à Antananarivo.

En première partie, nous présenterons un état des lieux des connaissances concernant ces pathogènes (cryptosporidies, *I. belli*, *C. cayetanensis*, microsporidies) concernant leur biologie, épidémiologie, pathologie, diagnostic et traitement, suivi d'un rappel des liens entre malnutrition, immunodépression et diarrhées. Ensuite, les aspects techniques de ces travaux seront détaillés et les résultats obtenus. Enfin, les résultats seront discutés et mis en perspective

Partie 1:

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Les cryptosporidies

1.1.1. Généralités

Les cryptosporidies sont des parasites protozoaires du phylum Apicomplexa retrouvés dans le tube digestif de l'Homme et de nombreux vertébrés.¹⁻³ Elles peuvent provoquer des diarrhées ou avoir un portage asymptomatique et sont des pathogènes opportunistes. Il existe de nombreuses espèces et génotypes (Figure 1), dont seulement certaines sont reconnues comme pathogènes pour l'Homme.

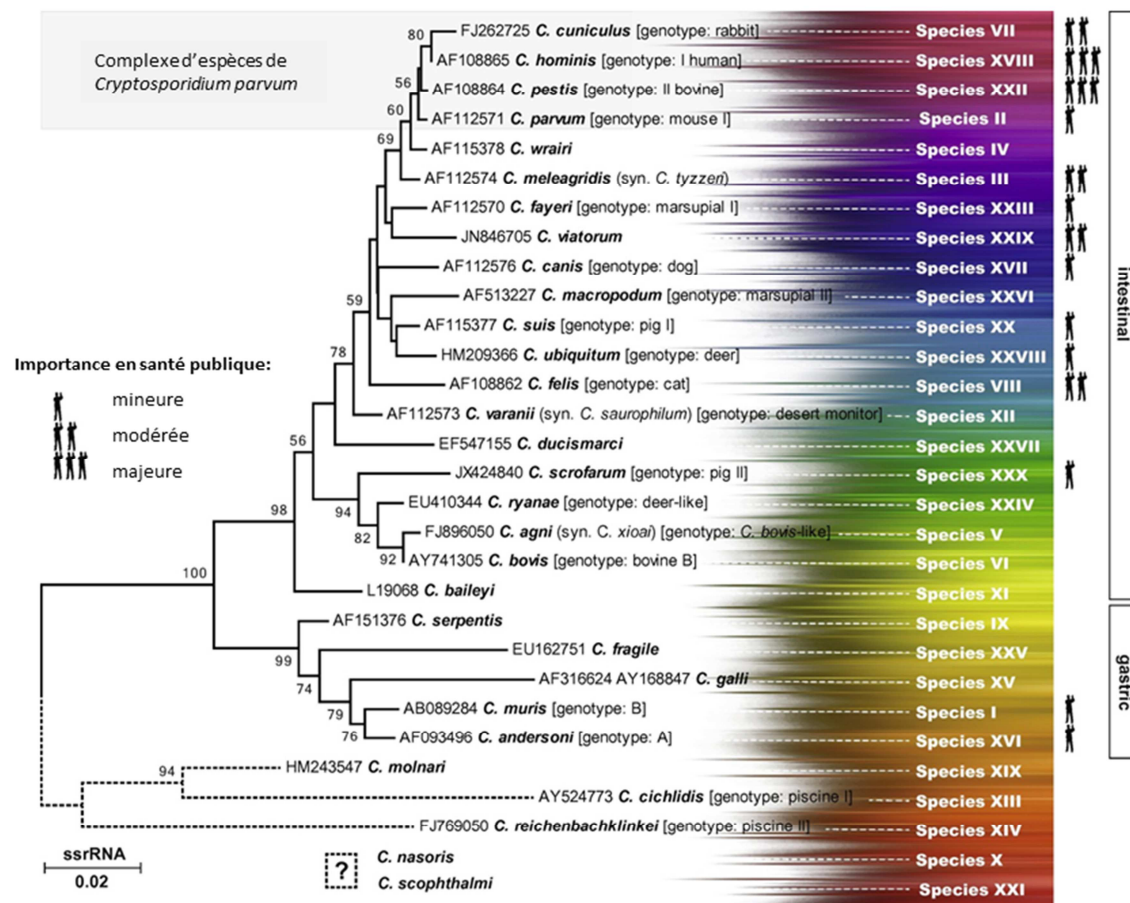


Figure 1:Arbre phylogénétique basé sur les séquences de la petite sous-unité ribosomale des 28 espèces de cryptosporidies officiellement caractérisées.

(Traduit d'après J. Slapeta, Int J Parasitol. 2013).

Chez l'Homme, les espèces pathogènes retrouvées sont principalement *C. parvum*, *C. hominis*, *C. pestis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, *C. suis*.³⁻⁶

1.1.2. Cycle des cryptosporidies

Les cryptosporidies ont une transmission féco-orale par ingestion d'oocystes directement infectants dès leur émission. Dans le tube digestif, l'oocyste libère des sporozoïtes qui vont se fixer au pôle apical des cellules épithéliales via des récepteurs et provoquer la formation d'une vacuole (Figure 2). Il est à noter que suivant l'espèce, les cryptosporidies peuvent avoir un tropisme préférentiel pour la muqueuse gastrique ou intestinale. La vacuole parasitophore formée a la particularité d'être intracellulaire mais extracytoplasmique et va modifier le cytosquelette de la cellule afin de créer une interface pour capter les nutriments de la cellule hôte. Le parasite devient alors un trophozoïte. Par la suite, un cycle de réplication asexuée est réalisé produisant des schizontes et libérant des mérozoïtes de type I. Les mérozoïtes de type I peuvent alors recommencer des cycles de reproduction asexuée en contaminant d'autres cellules épithéliales ou entamer un cycle de reproduction sexuée. Le cycle sexué débute par la génération de mérozoïtes de type II qui se transforment ensuite en gamétocytes. On distingue les microgamétocytes des macrogamétocytes, les premiers fécondant les seconds pour aboutir à des oocystes qui peuvent réinfecter le tube digestif de l'hôte ou être disséminés dans l'environnement.^{7,8}

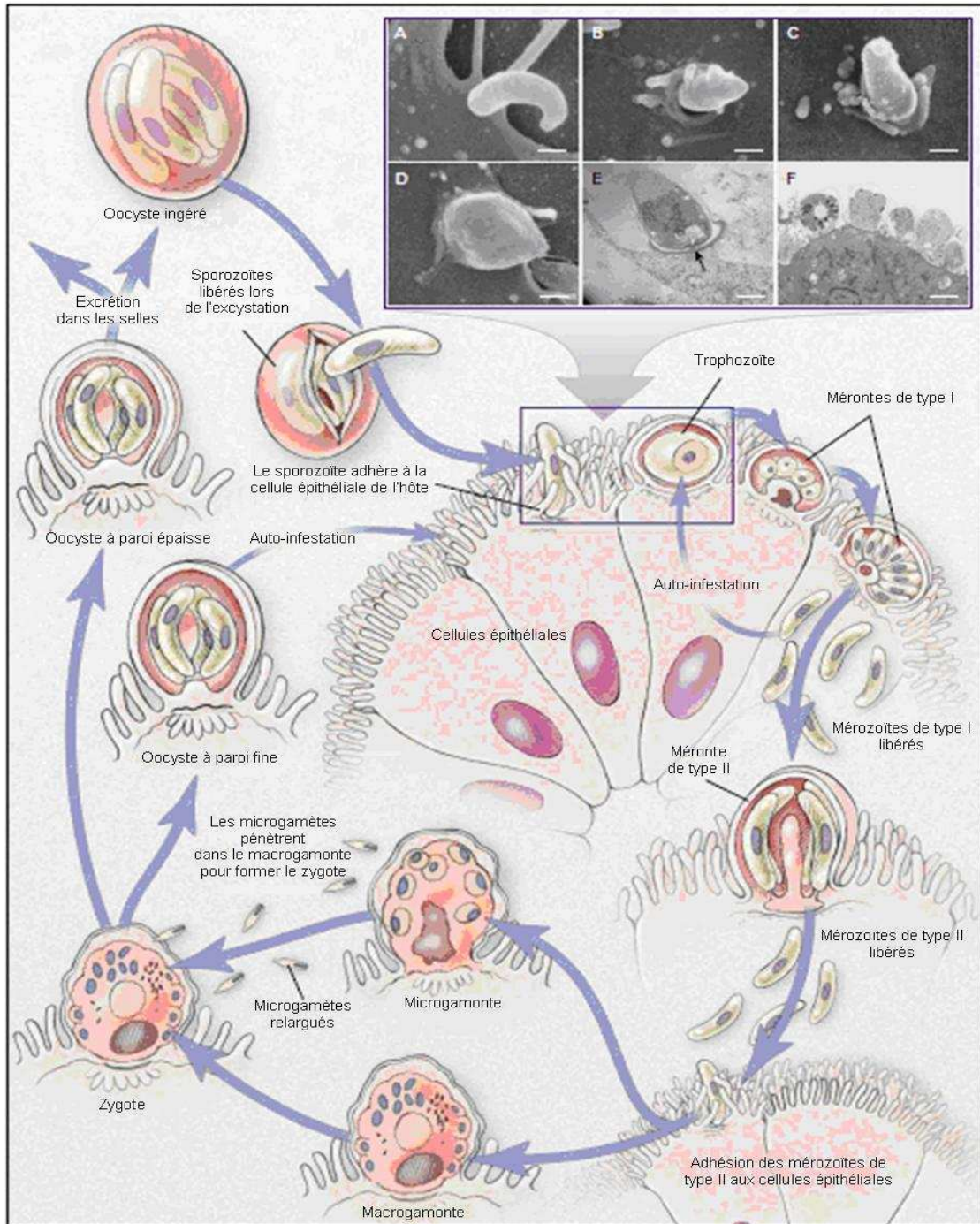


Figure 2: Cycle reproductif de *Cryptosporidium* spp.

(D'après Chen et al., NEJM, 2002)

1.1.3. **Mode de contamination**

La contamination se fait par ingestion d'oocystes de cryptosporidie et peut être directe ou indirecte. Les oocystes ont la particularité d'être directement contaminants avec une dose infectante de 10 à 100 oocystes et très résistants dans l'environnement.⁷ Les contaminations directes peuvent être manuportées ou par contact avec un individu ou un animal infecté, généralement du bétail.^{2,9} Concernant les contaminations indirectes, on recense des cas liés à la consommation de fruits, de crudités, d'herbes aromatiques...¹⁰ Il y a aussi possibilité de contagage par l'eau, avec des épidémies liées à l'eau du réseau de distribution, de piscine et à usage récréationnel, de sources et de lacs.¹¹ Ces contagages liés à l'eau sont d'autant plus à craindre que les oocystes sont naturellement résistants à la chloration et à la plupart des désinfectants.⁷

1.1.4. **Epidémiologie des cryptosporidies**

Les cryptosporidies sont des pathogènes cosmopolites. Leur réservoir est soit humain comme dans le cas de *C. hominis*, soit animal pour les autres espèces.¹² La contamination liée au péril fécal associée à une résistance aux désinfectants chlorés explique la présence sporadique mais assez fréquente de ces parasites dans les pays industrialisés. En France 407 cas ont été recensés de 2006 à 2009.¹³ Ce chiffre est probablement largement sous-estimé, car il a été montré dans la population générale que de nombreux cas de cryptosporidioses passaient inaperçus et que le nombre de cas diagnostiqués est grandement lié aux techniques de détection utilisées.^{14,15} Dans les pays du Sud, la cryptosporidiose est bien présente et non négligeable parmi les causes de diarrhée, notamment chez le dénutri et l'immunodéprimé.^{16,17} A Madagascar, il n'y avait qu'une seule étude portant sur 215

enfants diarrhéiques hospitalisés à Antananarivo. Une incidence de 5,6% pour les cryptosporidies était retrouvée, ce qui confirme leur présence sur la Grande Île.¹⁸ On observe aussi des variations saisonnières d'incidence. En France, on relève plus de cas à la fin de l'été et au début de l'automne.¹³ A Madagascar, il y aurait plus de cas pendant la saison des pluies.¹⁸

Parmi les espèces pathogènes, on retrouve majoritairement *C. parvum* et *C. hominis*. En France, on observe respectivement *C. parvum* et *C. hominis* dans 54,2 % et 36,5 % des cas, avec des variations de fréquence d'une année sur l'autre.¹⁹ A Madagascar, la seule publication disponible présente *C. hominis* comme espèce majoritaire.¹⁸ Les autres espèces, plus rares sont associées à des transmissions zoonotiques sporadiques.²⁰

1.1.5. **Pouvoir pathogène des cryptosporidies**

Les cryptosporidies sont responsables de diarrhées persistantes, en général non sanglantes. Après une incubation de sept à dix jours, la diarrhée apparaît accompagnée de douleurs abdominales, nausées et parfois vomissements. Chez l'immunocompétent, les symptômes disparaissent spontanément en deux semaines. Leur caractère opportuniste s'exprime chez l'immunodéprimé (SIDA, patients transplantés...); la symptomatologie classique étant une diarrhée aqueuse persistante avec malabsorption conduisant progressivement à la cachexie s'il n'y a pas de restauration immunitaire.^{7,21} Cette infection chez le sidéen s'accompagne fréquemment d'une colonisation des voies biliaires avec cholangite sclérosante qui contribue au passage à la chronicité. Un portage asymptomatique chez l'immunocompétent ou des symptômes sévères nécessitant une réhydratation

parentérale peuvent également être observés.⁷ Ces différences de pathogénicité sont encore mal comprises, mais plusieurs pistes sont explorées : le rôle de l'immunité de l'hôte qu'elle soit ou non altérée, du HLA de l'hôte, de la souche de *Cryptosporidium*.^{7, 22,23}

Chez l'enfant malnutri, la pathogénicité des cryptosporidies est particulière. Les cryptosporidies peuvent être responsables de diarrhées chroniques avec atrophie villositaire et malabsorption aggravant la malnutrition. Il peut y avoir aussi un portage jugé asymptomatique, mais qui aurait en réalité un impact négatif important sur le développement physique et intellectuel.²⁴ Ces constatations restent à confirmer, mais on suspecte fortement la cryptosporidiose comme étant un facteur aggravant ou déclencheur de malnutrition.²⁵⁻²⁷

Enfin, il a été décrit des cas de cryptosporidiose extra-intestinale surtout chez l'immunodéprimé, dans les canaux biliaires et pancréatiques, dans l'estomac, les poumons, l'oreille moyenne.⁷

1.1.6. Diagnostic de la cryptosporidiose

Il repose essentiellement sur la biologie. Un examen parasitologique des selles conventionnel est insuffisant pour diagnostiquer une cryptosporidiose. On fait appel à des colorations spécifiques telles que la coloration de Ziehl-Neelsen modifié ou de Kinyoun colorant les oocystes de *Cryptosporidium* spp en rose (Figure 3). Cette coloration historique est peu sensible, longue, mais assez simple à réaliser. La faible sensibilité implique de rechercher les cryptosporidies sur trois selles différentes avant d'exclure formellement une cryptosporidiose. Il existe d'autres colorations que nous ne développerons pas, tout comme le diagnostic sur biopsie duodénale.

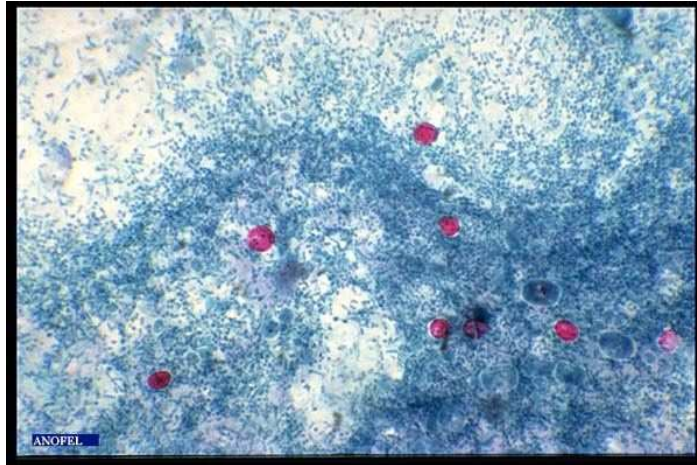


Figure 3: Oocystes de *Cryptosporidium* spp. colorés au Ziehl-Neelsen, observés au x1000
(d'après ANOFEL).

De nouvelles techniques ont fait leur apparition améliorant la sensibilité et facilitant le dépistage. Il faut citer les tests antigéniques Enzyme ImmunoAssay (EIA) et les tests immunochromatographiques, bien que coûteux permettent un diagnostic rapide et aisé sur des selles. Leur sensibilité est satisfaisante, similaire à la microscopie pour les espèces courantes de cryptosporidies.^{28,29} L'immunofluorescence directe (IFD) est aussi une technique très intéressante de par sa sensibilité, mais plus difficile à mettre en œuvre.¹⁵ Il y a enfin les techniques de biologie moléculaire, plus sensibles, permettant de faire le diagnostic d'espèce, de documenter l'origine d'une épidémie.^{6,30} Les sérologies ne sont que peu intéressantes étant données les nombreuses cicatrices sérologiques dans la population générale.⁷

1.1.7. Traitement de la cryptosporidiose

La prise en charge de la cryptosporidiose est différente suivant le statut immunitaire du patient. Chez l'immunocompétent, un traitement symptomatique de la diarrhée associé une alimentation adaptée est généralement suffisant. Le nitazoxanide (Alinia® sous autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative) peut être prescrit devant une diarrhée à *Cryptosporidium*, permettant une réduction de la durée des symptômes.³¹ Chez l'immunodéprimé, le nitazoxanide n'a pas d'efficacité prouvée et le meilleur traitement actuel reste la restauration immunitaire. La restauration immunitaire par trithérapie antirétrovirale chez le sidéen est si efficace qu'un effet antiparasitaire propre aux inhibiteurs de protéase est suspecté.³² En revanche, le nitazoxanide est efficace chez l'enfant dénutri non infecté par le VIH au niveau de la résolution des symptômes, de l'élimination du parasite et de la survie.^{32,33}

Enfin, il faut noter que le statut administratif d'ATU de la spécialité Alinia® réserve la prescription de nitazoxanide à des médecins hospitaliers en France. A Madagascar, après renseignements auprès du Ministère de la Santé, aucune spécialité contenant du nitazoxanide n'était officiellement disponible en 2012. L'accès au nitazoxanide est donc aussi un obstacle à un traitement efficace de la cryptosporidiose.

Au stade expérimental, d'autres molécules auraient une efficacité clinique modérée sur *Cryptosporidium* spp parmi lesquelles la paromomycine, l'azithromycine et la rifabutine.³² Des études *in vitro* récentes ont aussi mis en évidence une activité anticryptosporidiale de composés d'origine végétale (curcuma, acide ginkgolique, isoflavones).³⁴⁻³⁶ Ces dernières recherches ne sont pas encore assez avancées pour permettre des essais chez l'Homme.

1.2. *Isospora belli*

1.2.1. Généralités

Isospora belli appelé aussi *Cystoisospora belli* est un protozoaire coccidie, parasite intestinal strict de l'Homme. C'est la seule espèce du genre *Isospora* pathogène chez l'Homme, responsable de diarrhées et ayant des caractéristiques de pathogène opportuniste.³⁷⁻³⁹

1.2.2. Cycle d'*Isospora belli*

La contamination se fait par ingestion d'oocystes matures (Figure 4). Les oocystes libèrent par l'intermédiaire de sporocystes des sporozoïtes qui vont pénétrer dans les entérocytes de l'intestin grêle. Un cycle de reproduction intracellulaire et asexué (schizogonie) va alors se dérouler, aboutissant à la production de mérozoïtes. Les mérozoïtes peuvent à leur tour réaliser un cycle de schizogonie entretenant l'infestation de l'hôte ou entamer le cycle de reproduction sexuée (gamogonie). La gamogonie débute par la pénétration des mérozoïtes dans l'entérocytes, produisant des macrogamètes et des microgamètes. Les microgamètes biflagellés sont libérés par lyse de la cellule hôte et vont nager vers un macrogamète pour le féconder. La fécondation produit un zygote qui va évoluer en oocyste qui sera libéré dans les selles. Cet oocyste a la particularité de nécessiter une maturation dans le milieu extérieur pour devenir infectant.^{39,40} Les conditions de maturation dans le milieu extérieur sont mal connues mais pourraient expliquer la répartition préférentiellement tropicale de cette parasitose.

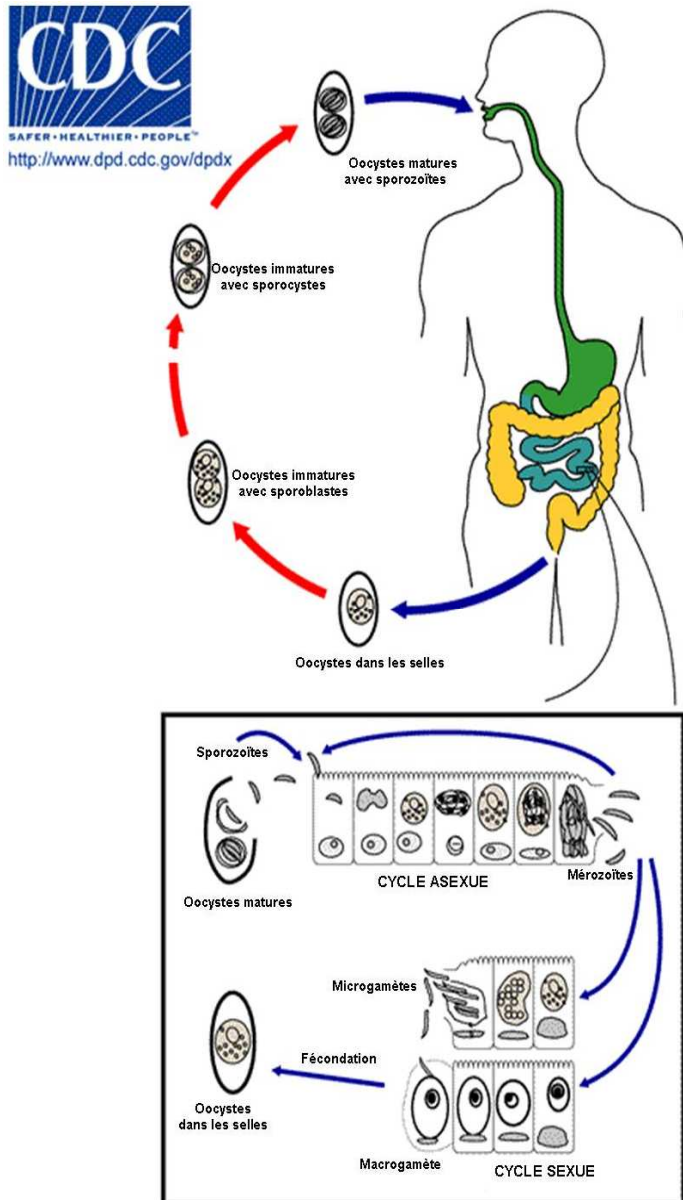


Figure 4: Cycle reproductif d'*I. belli*.

(D'après le site Internet du CDC).

1.2.3. Mode de contamination

Le mode de contamination est là encore féco-oral, uniquement indirect avec de l'eau ou des aliments contaminés du fait de la nécessité de maturation des oocystes dans l'environnement pour devenir infectants.

1.2.4. **Epidémiologie d'*Isospora belli***

I. belli est un parasite cosmopolite préférentiellement tropical qui n'a pas de réservoir animal connu. Ces caractères en font un pathogène très rare dans les pays industrialisés, retrouvé chez le voyageur ou chez l'immunodéprimé et notamment chez les patients infectés par le VIH avant l'arrivée des trithérapies.^{41,42} En France, actuellement les rares cas d'isosporoses liés au VIH proviennent surtout d'Afrique subsaharienne.⁴³ Dans les pays en développement, la fréquence de l'isosporose est plus élevée, surtout dans la population infectée par le VIH mais aussi dans la population générale.^{44,45} Pour le moment, il n'y a aucune donnée sur l'isosporose ou la présence d'*I. belli* à Madagascar dans la base de données Pubmed.

1.2.5. **Pouvoir pathogène d'*Isospora belli***

I. belli est responsable après une incubation d'environ quinze jours classiquement de diarrhées non sanglantes accompagnées de fièvre, douleurs abdominales, nausées, vomissements et parfois d'une hyperéosinophilie. L'infection chez l'immunocompétent est généralement spontanément résolutive en quelques jours, on recense néanmoins des cas d'infections aiguës sévères et d'infections chroniques, dont certaines auraient duré plusieurs années.³⁹

Chez l'immunodéprimé (SIDA, lymphomes...), la clinique prend la même forme que chez l'immunocompétent avec une fréquence plus importante d'infections symptomatiques sévères, qu'elles soient aiguës avec une déshydratation, ou chroniques avec une malabsorption. On peut aussi observer exceptionnellement chez l'immunodéprimé des formes extra-intestinales avec cholangite, atteinte des ganglions mésentériques, du foie, de la rate.^{39,40,46}

Chez l'enfant, l'isosporose est souvent plus sévère que chez l'adulte avec un risque accru de déshydratation ou de malabsorption pouvant conduire à une dénutrition.^{39,47} Ce caractère particulièrement pathogène en lien avec la dénutrition en fait un candidat pour étudier les parasites intestinaux opportunistes chez l'enfant.

1.2.6. Diagnostic de l'isosporose

Le diagnostic est essentiellement biologique, basé sur l'examen parasitologique des selles. On retrouve des oocystes ovales (20-30 µm de long et 10-19 µm de large) dans les selles à l'état frais ou après concentration parasitaire. Ils sont assez souvent accompagnés de cristaux de Charcot Leyden (Figure 5). Les oocystes sont visibles en coloration de Ziehl Neelsen modifiée ou avec d'autres techniques (Giemsa, technique de Weber, auramine). On ne peut exclure d'isosporose qu'après au moins trois prélèvements de selles négatifs en raison de la faible sensibilité de cette recherche. Il existe aussi des techniques de réaction en chaîne de la polymérase (PCR), mais qui sont réservées pour l'instant à la recherche.^{48,49} Enfin, le diagnostic est réalisé quelques fois par microscopie sur biopsie duodénale ou sur Enterotest®^{39,40,50}.



Figure 5: Oocystes d'*I. belli* observés au microscope à l'état frais.

(http://www.atlas-protozoa.com/gallery.php?SOT_CAP=ISOSP&link=index.php#1)

1.2.7. **Traitement de l'isosporose**

L'isosporose répond très bien au cotrimoxazole (Bactrim®) qui est le traitement de première intention. L'association pyriméthamine-sulfadiazine ou sulfadoxine peut être une alternative thérapeutique, avec supplémentation en acide folinique. Chez l'immunodéprimé, le traitement s'accompagne si possible d'une restauration immunitaire.^{39, 40,50}

1.3. ***Cyclospora cayetanensis***

1.3.1. **Généralités**

Cyclospora cayetanensis est un protozoaire parasite de l'intestin, strictement humain dont le caractère pathogène n'a été clairement admis que dans les années 1990. Il appartient au phylum Apicomplexa et à la sous-classe de coccidies. Il s'agit de la seule espèce du genre *Cyclospora* pathogène chez l'Homme.⁵¹

1.3.2. **Cycle et mode de contamination**

Le cycle parasitaire de *C. cayetanensis* est similaire à celui des autres apicomplexae (Figure 6). L'hôte ingère par l'alimentation ou l'eau un oocyste mature qui libère dans l'intestin des sporozoïtes infectants. Ces sporozoïtes vont se reproduire de manière asexuée générant des mérontes de type I et de type II. Les mérontes de type II produiront ensuite des microgamètes et macrogamètes aboutissant à la formation de zygotes puis d'oocystes. Ces oocystes non sporulés et non infectants sont émis dans les selles et deviennent infectants après maturation pendant sept à quinze jours dans l'environnement. Les détails de ce cycle sont

encore mal connus et notamment les conditions de maturation des oocystes dans l'environnement. ^{52,53} On a cependant remarqué que les oocystes sont très résistants aux mesures de désinfection et ont de fortes capacités d'adhésion aux fruits et légumes qu'ils contaminent. ^{53,54}

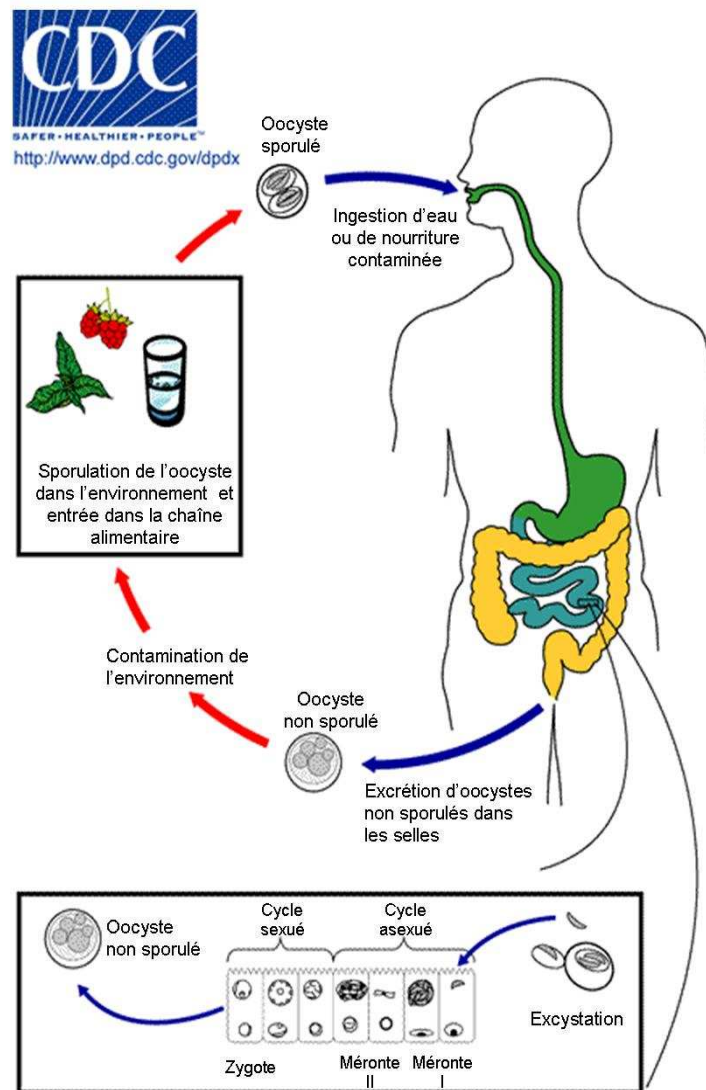


Figure 6: Cycle reproductif de *C. cayetanensis*.

(D'après le site Internet du CDC).

La contamination par *C. cayetanensis* est fortement liée au péril fécal et à l'alimentation. L'ingestion de crudités même lavées, de baies et de fruits de mer crus ou peu cuits sont à risque dans les zones d'endémie, tout comme les eaux de boisson et récréatives. Il ne peut y avoir de contamination directe du fait de la nécessité de maturation dans le milieu extérieur⁵⁵.

1.3.3. **Epidémiologie de *Cyclospora cayetanensis***

La répartition mondiale de *C. cayetanensis* est mal connue. Ce parasite est considéré comme endémique en Amérique du Sud, présent avec certitude dans certains pays africains (Nigéria, Ouganda, Egypte, Tanzanie)^{52,56} et en Asie.^{52,53,56-58} On ne recense de cas autochtones dans les pays développés que lors d'épidémies dues à des fruits et légumes importés ou des eaux contaminées, comme aux Etats-Unis en 1996 et 1997.⁵⁹ Les autres cas de cyclosporoses sont généralement liés aux voyages. Ainsi, on suspecte fortement la présence de la cyclosporose à Madagascar, bien que cela n'ait pas encore été prouvé, excepté un cas chez un voyageur revenant de la Grande Île.⁶⁰ On ne connaît actuellement pas de réservoir animal pour *C. cayetanensis*, mais des parasites du même genre chez des primates ont été mis en évidence.⁵²

Le mode de contamination fortement lié à l'alimentation et la grande résistance des oocystes n'expliquent pas toujours une contamination. Dans les pays en développement, on suspecte d'autres modes de contamination de coexister comme le contact avec la terre pour les enfants, ou la présence d'un animal domestique.⁶¹ De même, des variations saisonnières du nombre de cas de cyclosporose ont été observées, mais la saison incriminée varie d'un pays à l'autre.⁵⁶

L'épidémiologie de la cyclosporose reste donc méconnue du fait de sa découverte assez récente et de sa rareté apparente.

1.3.4. **Pouvoir pathogène de *Cyclospora cayetanensis***

Ce protozoaire est classiquement responsable de gastro-entérites fébriles chez l'immunocompétent. On observe après une incubation d'environ sept jours des diarrhées aqueuses, avec douleurs abdominales, nausées, vomissements, fièvre, anorexie et parfois douleurs musculaires ou articulaires. Les symptômes sont plus francs chez le petit enfant, parfois sévères chez l'immunodéprimé. Une des complications possible chez les porteurs du VIH est la cholécystite.

Enfin dans de très rares cas, on a constaté des complications post-infectieuses telles que le syndrome de Guillain-Barré ou le syndrome de Reiter.^{52,53}

1.3.5. **Diagnostic et traitement de la cyclosporose**

Il repose sur l'examen parasitologique des selles, répété sur plusieurs prélèvements en cas de fortes suspicions afin d'exclure formellement une cyclosporose. Le parasite est visible à l'état frais et après concentration parasitaire biphasique (Figure 7). La recherche d'autofluorescence est une technique alternative ou complémentaire intéressante au niveau de la sensibilité et de la spécificité. *C. cayetanensis* possède en effet une fluorescence bleue naturelle et intense sous rayonnement ultraviolet (UV) à 365 nm.⁶² La coloration de Ziehl-Neelsen modifiée est aussi caractéristique, *C. cayetanensis* apparaissant typiquement faiblement coloré ou en négatif.^{52,53}

Des techniques de PCR (PCR en temps réel, multiplex) sont disponibles et très sensibles, mais leur utilisation convient mieux aux activités de recherche.^{49,63}



Figure 7: Oocystes de *C. cayetanensis* observés au microscope à l'état frais.

(D'après ANOFEL).

Le traitement de référence de la cyclospore est le cotrimoxazole. La ciprofloxacine peut être une alternative thérapeutique en cas d'allergie aux sulfamides.^{52,53,55}

1.4. Les microsporidies

1.4.1. Généralités

Les microsporidies sont un clade d'eucaryotes appartenant au règne fongique.⁶⁴ Elles ont le plus petit génome connu parmi les eucaryotes et sont dépourvues de mitochondries. Les microsporidies se comportent en parasites intracellulaires pour de nombreux animaux (mammifères, poissons, insectes), et quelques espèces sont pathogènes pour l'Homme.

Elles ont un tropisme principalement intestinal, mais aussi cornéen, broncho-pulmonaire, naso-sinusal, génito-urinaire, musculaire avec très souvent un caractère opportuniste.⁶⁵⁻⁶⁷

Parmi les espèces les plus fréquemment retrouvées, on cite *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* (appelé autrefois *Septata intestinalis*), et dans une moindre mesure *Encephalitozoon hellem* et *Encephalitozoon cuniculi*.

Il existe d'autres espèces plus rarement retrouvées chez l'Homme, telles que *Anncaliia algerae*, *Anncaliia connori*, *Microsporidium africanum*, *Nosema ocularum*, *Pleistophora hominis*, *Vittaforma corneae*.⁶⁷⁻⁶⁹ Nous nous intéresserons ici seulement à *Enterocytozoon bieneusi* et au genre *Encephalitozoon* spp.

1.4.2. Cycle et mode de contamination

L'Homme s'infecte par contact avec des spores de microsporidies (ingestion, contact avec le tissu cible, inhalation...) (Figure 8). La spore sous certaines conditions physico-chimiques va extérioriser un organe particulier, le filament polaire, qui va « injecter » dans la cellule hôte le sporoplasme contenu dans la spore. La microsporidie va alors réaliser l'ensemble de son cycle intracellulaire soit dans le cytoplasme de la cellule hôte (cas d'*E. bieneusi*), soit dans une vacuole parasitophore (cas d'*Encephalitozoon* spp). La multiplication se fait par schizogonie (divisions multiples) pour *E. bieneusi* ou par mérogonie (divisions binaires) pour le genre *Encephalitozoon* spp, produisant des mérontes. Les mérontes vont ensuite mûrir en sporontes, puis en spores. Les spores envahiront la cellule avant d'être libérées par lyse, prêtes à infecter d'autres cellules hôtes ou d'autres hôtes. Les détails du cycle reproductif sont complexes et encore mal connus.^{66,70}

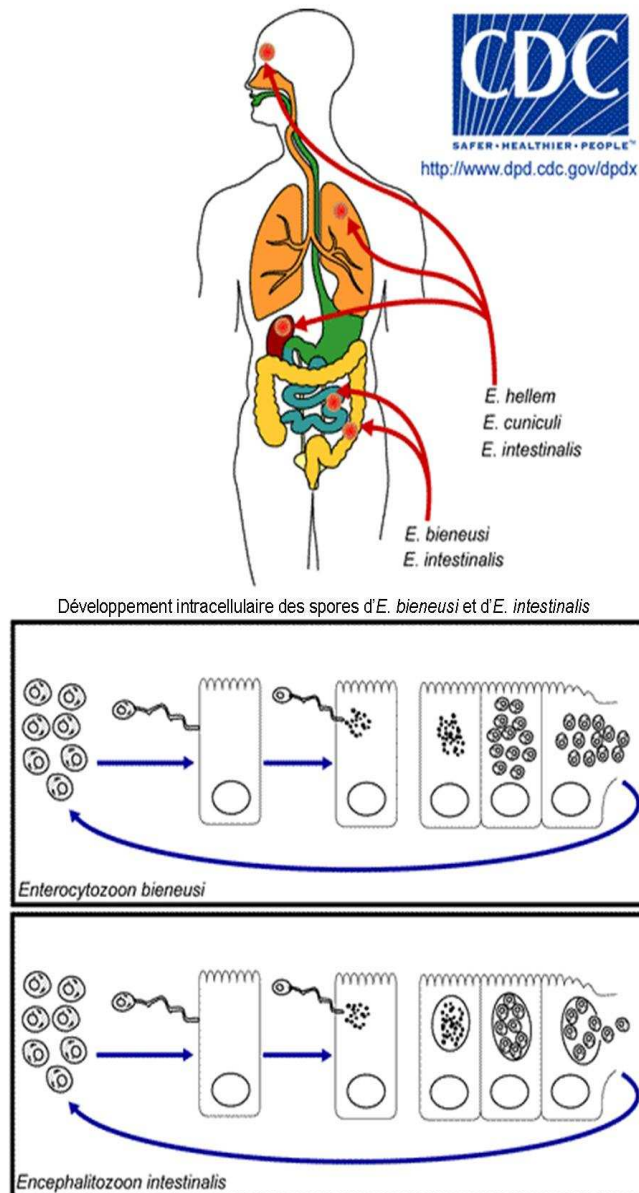


Figure 8: Cycle reproductif des microsporidies (d'après le site Internet du CDC).

La microsporidiose digestive est consécutive à l'ingestion de spores, directement par transmission d'un hôte à un autre ou indirectement par l'eau ou des aliments contaminés.

Les autres modes de contamination sont responsables d'autres types d'infections. Les kératites à microsporidies sont dues contact de spores avec la cornée, soit par des lentilles de contact contaminées, soit par un liquide contaminé ou un élément de l'environnement, soit exceptionnellement lors de greffe de cornée.

Les formes urogénitales seraient sexuellement transmissibles et les formes pulmonaires liées à l'inhalation de spores.^{66,68}

En résumé, les modes de contamination pour la microsporidiose sont multiples et dépendent du type d'atteinte. Il est à noter qu'un terrain affaibli, malnutri ou immunodéprimé favorise fortement l'apparition de la maladie.^{66,68} Nous nous intéresserons par la suite exclusivement aux microsporidioses intestinales.

1.4.3. **Epidémiologie des microsporidies**

Les microsporidies sont présentes sur tous les continents, leur mise en évidence en pathologie humaine étant souvent liée à des patients atteints de SIDA.^{66,68,69,71,72} Pour l'instant, il n'y a pas dans la littérature de cas de microsporidiose humaine recensé à Madagascar. La prévalence de la microsporidiose chez l'Homme varie d'environ 1 à 20 % selon les pays et les techniques utilisées.⁶⁶ Il y a eu en France un pic de fréquence pendant l'épidémie de SIDA, jusqu'à l'arrivée de trithérapies efficaces.^{73,74} Aujourd'hui les microsporidioses à *E. bienewisi* et *Encephalitozoon* spp sont exceptionnelles, très souvent liées à des patients immunodéprimés et nous n'avons pas d'estimations de fréquence disponibles.⁷⁵ Une étude italienne retrouve sur 5351 patients ayant eu une parasitologie des selles seulement deux cas de microsporidiose à *E. intestinalis*.⁷⁶ Dans des pays où les conditions socio-économiques sont moins favorables, les microsporidioses sont plus fréquentes.^{72,77,78} La présence d'un réservoir animal est suspectée pour les microsporidies intestinales, mais ce réservoir semble être composé de multiples espèces.⁷⁹⁻⁸²

D'une manière générale, l'épidémiologie des microsporidioses en dehors du SIDA est mal connue tout comme son cycle et sa biologie.

1.4.4. **Pouvoir pathogène des microsporidies**

Les microsporidies ont un pouvoir pathogène gastro-intestinal opportuniste très marqué. On observe lors d'immunodépression de type cellulaire (VIH, transplantations...) des diarrhées aqueuses, importantes, chroniques et d'évolution progressive vers la cachexie en l'absence de traitement. Ces diarrhées sont accompagnées de signes non spécifiques de type nausées, vomissements, douleurs abdominales et fièvre. On peut aussi observer dans de rares cas des cholangites, des péritonites, des hépatites ou des atteintes disséminées lors d'immunodépression profonde.⁶⁶ Chez l'immunocompétent, on observe des portages asymptomatiques, mais on a décrit de rares cas de gastroentérites spontanément régressives chez le voyageur qui prouveraient que les microsporidies ne sont pas des opportunistes exclusifs.⁸³ Chez l'enfant souffrant de diarrhées prolongées, une corrélation statistique entre le retard de reprise de poids et le portage intestinal d'*E. bienewisi* a été mise en évidence par Mor *et al.* particulièrement lors de co-infection avec le VIH.⁷¹ Les microsporidies pourraient donc avoir un rôle chez l'enfant dénutri et/ ou diarrhéique.

Les infections à microsporidies sur d'autres sites (cornée, muscles, tractus urinaire, poumons, cerveau, peau) ne seront pas développées.

1.4.5. Diagnostic des microsporidioses intestinales

Le diagnostic repose sur la mise en évidence des microsporidies et l'identification de l'espèce en cause. Des techniques microscopiques sont réalisées sur selles ou biopsie intestinale ; avec en premier lieu la coloration Trichrome ou technique de Weber (Figure 9) considérée comme technique de référence mais de sensibilité moyenne.^{69,84} Une alternative est l'utilisation d'un colorant fluorescent marquant la chitine (Uvitex 2B ou calcofluor blanc) et permettant l'observation au microscope à fluorescence des microsporidies. Cette technique a une meilleure sensibilité mais une moindre spécificité que la coloration trichrome.⁸⁵ Il existe également d'autres méthodes comme la coloration de Giemsa pour les biopsies intestinales.

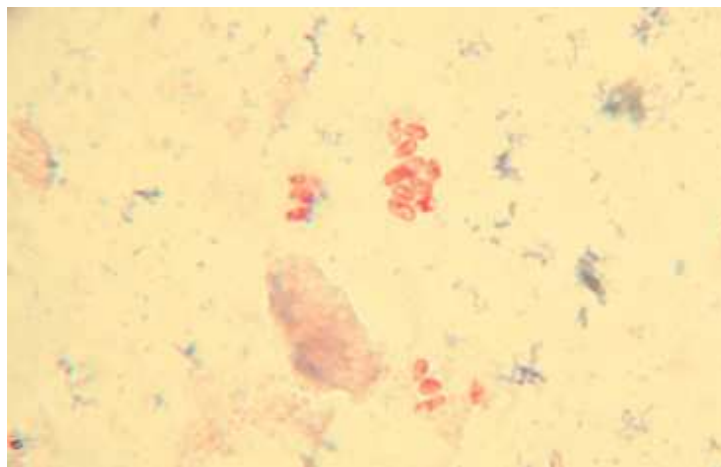


Figure 9: Microsporidies colorées par la technique de Weber.

(http://www.atlas-protozoa.com/gallery.php?SOT_CAP=MICR&link=index.php#1)

Le diagnostic de l'espèce en cause est quant à lui plus difficile. La microscopie électronique à transmission sur biopsie permet de faire le diagnostic d'espèce.⁶⁶ Néanmoins, sa complexité de mise en œuvre empêche son usage en diagnostic de

routine. De plus, elle ne permet pas de distinguer *E. hellem* d'*E. cuniculi*. Un typage par immunofluorescence a également été développé avec des anticorps monoclonaux ciblant *E. bienewisi* et *E. intestinalis*. Toutefois, le diagnostic d'espèces plus exotiques par cette technique est pour le moment impossible.

Enfin, la biologie moléculaire offre de nombreuses possibilités. Des PCR conventionnelles ciblant une ou plusieurs espèces permettent parfois un diagnostic d'espèce grâce à une enzyme de restriction.⁸⁶⁻⁸⁹ De nombreuses PCR en temps réel ont été également mises au point, basées sur des sondes Taqman®, multiplexées ou utilisant la technologie Luminex® associant la recherche de microsporidies à d'autres pathogènes intestinaux.^{49,90,91} Cependant, on ne dispose pas pour l'instant pas de PCR « universelle » ciblant toutes les microsporidies pathogènes chez l'Homme. La biologie moléculaire est donc un outil majeur permettant diagnostic d'espèce avec une excellente sensibilité, mais elle reste toujours difficile à mettre en place pour les laboratoires.

1.4.6. **Traitement des microsporidioses intestinales**

Actuellement, l'arsenal thérapeutique est limité. Pour les microsporidioses intestinales à *Encephalitozoon* spp, on dispose de l'albendazole (Zentel®), bien toléré et actif aussi bien chez l'immunocompétent que chez l'immunodéprimé. Les microsporidioses à *E. bienewisi* sont peu sensibles à l'albendazole, mais il existe en alternative de la fumagilline (Flisint®), extraite de la moisissure *Aspergillus fumigatus*. Toutefois, son caractère hématotoxique dose-dépendant limite la durée du traitement et impose une surveillance hématologique.

Face à ce manque d'options thérapeutiques, des essais sont en cours et quelques molécules ont été proposées : le nitazoxanide, un dérivé hémisynthétique de la fumagilline, les polyamines, les fluoroquinolones. Leur activité n'a pour l'instant seulement été prouvée *in vitro* ou sur modèle animal.^{66,69}

1.5. Dénutrition, immunodépression et diarrhées

1.5.1. Généralités

La malnutrition peut se définir comme un « état nutritionnel qui s'écarte de la normale [...] et qui est la conséquence d'une alimentation mal équilibrée en quantité et en qualité ».⁹² Cette définition englobe des états liés à une sous-alimentation (dénutritons, carences) ou à une suralimentation (obésité, syndrome métabolique). Malnutrition et dénutrition sont des termes souvent jugés équivalents alors qu'ils recouvrent des réalités différentes ; néanmoins nous entendrons par la suite la malnutrition comme étant la conséquence d'un déficit d'apport, tout comme la dénutrition.

1.5.2. Diagnostic de la dénutrition chez l'enfant de moins de cinq ans.

L'OMS et l'UNICEF ont défini la dénutrition de l'enfant sur la base de mesures anthropométriques et de signes cliniques, que sont la taille, le poids, le périmètre brachial (PB), la présence d'œdèmes bilatéraux.^{93,94} La dénutrition peut ainsi être diagnostiquée aisément et fournir aux soignants une classification avec prise en charge standardisée. En pratique, différents critères sont utilisés si l'on veut diagnostiquer une malnutrition aiguë ou chronique.

Selon les critères de l’OMS et de l’UNICEF, le diagnostic de la malnutrition chronique (MC) chez l’enfant de moins de cinq ans est assez aisé et se base sur l’écart du rapport taille-âge par rapport à des valeurs de références par l’intermédiaire d’un Z-score (Figure 10):

- malnutrition chronique modérée si Z-score (taille/âge) < - 2
- malnutrition chronique sévère si Z-score (taille/âge) < - 3

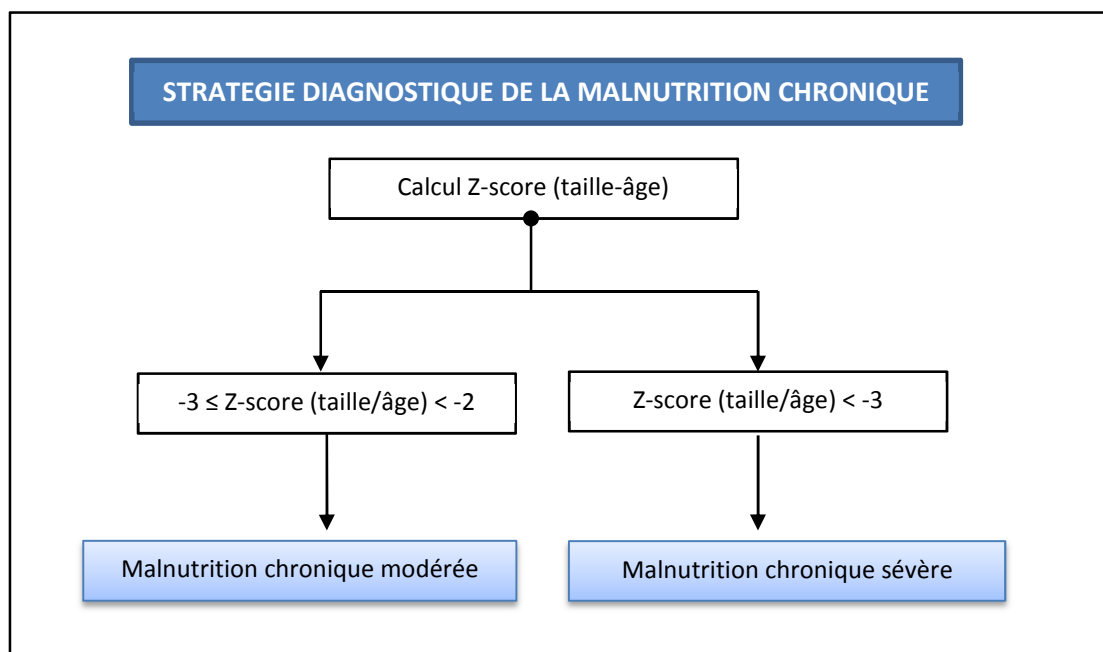


Figure 10: Démarche diagnostique de la malnutrition chronique chez l’enfant de moins de 60 mois, selon les critères de l’OMS et de l’UNICEF.

Ce diagnostic ne se fait toutefois que dans un contexte d’insécurité alimentaire et/ou d’apports inadaptés à l’enfant. En effet, un retard de croissance n’est pas toujours synonyme de malnutrition chronique.

Il peut être lié à une pathologie sous-jacente (infection chronique, maladie congénitale ou génétique, troubles endocriniens...). Inversement, une malnutrition chronique peut coexister avec un surpoids et un indice de masse corporelle (IMC) anormal.⁹⁴

Le diagnostic de la malnutrition aiguë est plus complexe (Figure 11). La malnutrition aiguë sévère (MAS) chez l'enfant de 6 à 60 mois est diagnostiquée par la présence d'au moins un des critères énoncés par l'OMS :

- Z-score (poids/taille) < -3
- périmètre brachial < 115 mm
- présence d'œdèmes bilatéraux

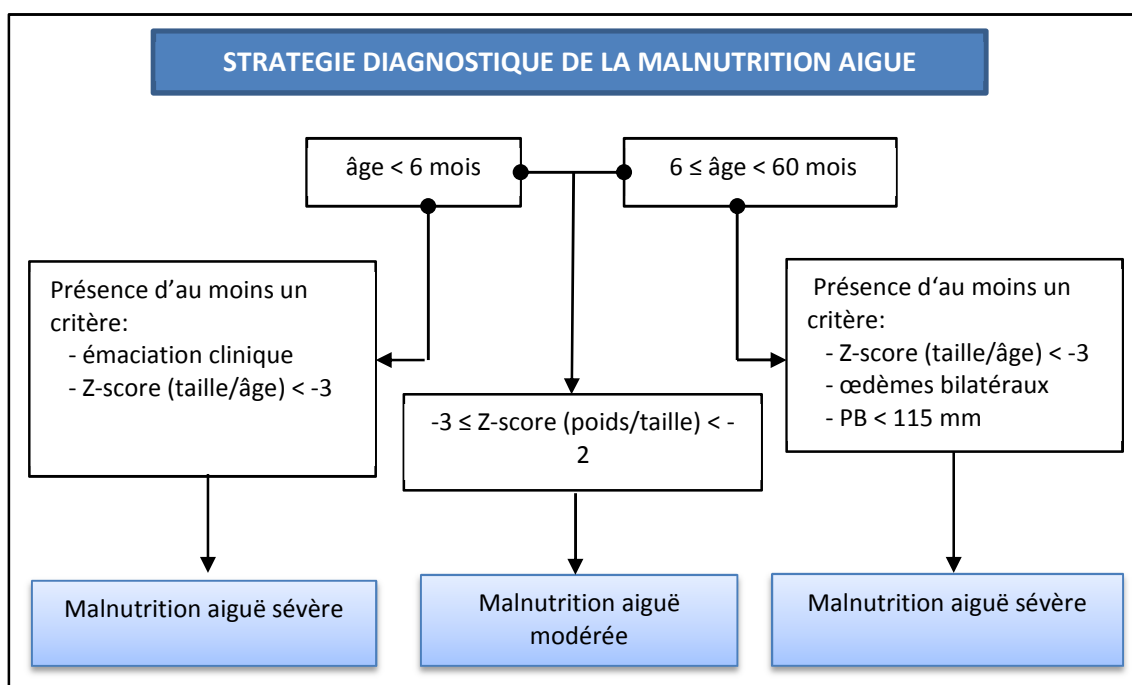


Figure 11: Démarche diagnostique de la malnutrition aiguë chez l'enfant de moins de 60 mois, selon les critères de l'OMS et de l'UNICEF.

Ces critères font l'objet d'un large consensus et permettent un diagnostic rapide. La malnutrition aiguë sévère (MAS) est en effet associée à une mortalité élevée en l'absence de prise en charge adaptée et est donc considérée comme une urgence thérapeutique.⁹³⁻⁹⁶ Néanmoins, le diagnostic de MAS reste problématique pour les enfants de moins de 6 mois où les critères ne sont pas encore définis clairement. Un enfant de moins de 6 mois sera considéré comme en état de MAS face à des symptômes de dénutrition sévère ou à un Z-score (poids/taille) < -3. Enfin, le diagnostic d'une malnutrition aiguë modérée reste basé sur un Z-score (poids/taille) compris entre - 2 et - 3.^{94,97}

1.5.3. Dénutritions et conséquences chez l'enfant

La dénutrition peut donc prendre différentes formes selon le caractère aigu ou chronique et s'il s'agit d'un déficit en macronutriments ou en micronutriments. Les déficits en macronutriments appelés aussi dénutrition protéino-énergétique peuvent donner deux tableaux assez différents s'il s'agit de dénutrition aiguë ou chronique.

D'une manière très schématique, on peut dire que la malnutrition aiguë est une émaciation s'accompagnant d'une perte de masse grasse et maigre et pouvant mettre en jeu le pronostic à court et à long terme de l'enfant. La malnutrition chronique se traduit par un retard de croissance avec un développement altéré de l'enfant et des répercussions à long terme sur les plans physique et intellectuel.^{25,98,99}

Les déficits en micronutriments sont liés essentiellement à des malnutritions chroniques car l'organisme dispose de réserves épuisables en vitamines et minéraux. Ces déficits provoquent des troubles fonctionnels pouvant toucher plusieurs systèmes physiologiques avec des risques de séquelles irréversibles.

Parmi ces déficits, on cite les carences en fer, iode, zinc, sélénium et vitamines A, C et E.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴

Ces différentes formes de dénutrition chez l'enfant se retrouvent presque toujours combinées, aggravant le pronostic à court et long terme avec un impact néfaste sur la croissance staturo-pondérale, le développement physique et intellectuel.⁹⁸ La dénutrition a aussi des conséquences immédiates sur le système cardio-vasculaire, la digestion, les fonctions hépatiques, l'osmolarité plasmatique, l'homéothermie, la régénération cutanéomuqueuse et la cicatrisation, l'hématopoïèse et le système immunitaire.^{104,105}

1.5.4. **L'immunodépression secondaire à la dénutrition**

Les effets généraux de la dénutrition sur le système immunitaire sont complexes avec pour conséquence une dégradation globale, hétérogène et progressive des différents mécanismes de défense. On peut observer une atrophie des organes lymphoïdes avec des troubles de la maturation des précurseurs lymphocytaires, une baisse des capacités de production des différents médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, leucotriènes, chemokines), ainsi que des anomalies dans le processus de phagocytose.^{104,106,107} Paradoxalement, une baisse du taux d'immunoglobulines sériques n'est pas souvent retrouvée et pourrait s'expliquer par un allongement global de la demi-vie des protéines en réponse au déficit énergétique. Toutefois, la sécrétion d'anticorps suite à une stimulation antigénique vaccinale peut être altérée et on observe aussi un déficit de synthèse des immunoglobulines A (IgA).^{104,108,109}

Au niveau de l'immunité des muqueuses digestives, la dénutrition provoque outre une réduction de la sécrétion d'IgA des anomalies de la muqueuse elle-même, par un ralentissement du renouvellement cellulaire, une sécrétion insuffisante de mucus et une atrophie villositaire. Les tissus lymphoïdes tels que la plaque de Peyer s'atrophient et un infiltrat paradoxal de lymphocytes dans la *lamina propria* de la muqueuse intestinale peut apparaître. Ces processus font intervenir notamment de nombreuses sous-populations leucocytaires, des cytokines, des récepteurs membranaires et la flore intestinale de manière très complexe et encore mal connue¹⁰⁴. Tous ces éléments, bien qu'encore mal expliqués, concourent à rendre le sujet malnutri particulièrement sensible aux infections digestives.

1.5.1. Dénutrition- diarrhées- immunodépression

La dénutrition induisant une immunodépression, un enfant dénutri a un risque plus élevé de diarrhées infectieuses. Réciproquement, les diarrhées chroniques peuvent induire un état de dénutrition, créant un cercle vicieux entre diarrhées, malnutrition et immunodépression. On peut donc considérer dénutrition et diarrhées comme intrinsèquement liées.^{24,25,110,111} Le cercle vicieux dénutrition-diarrhées-immunodépression serait également influencé par de nombreux autres paramètres tels que le patrimoine génétique du sujet, sa flore digestive, son alimentation, l'environnement et son niveau de contamination par des agents entéropathogènes, les pratiques d'hygiène, des facteurs socio-culturels (Figure 12).

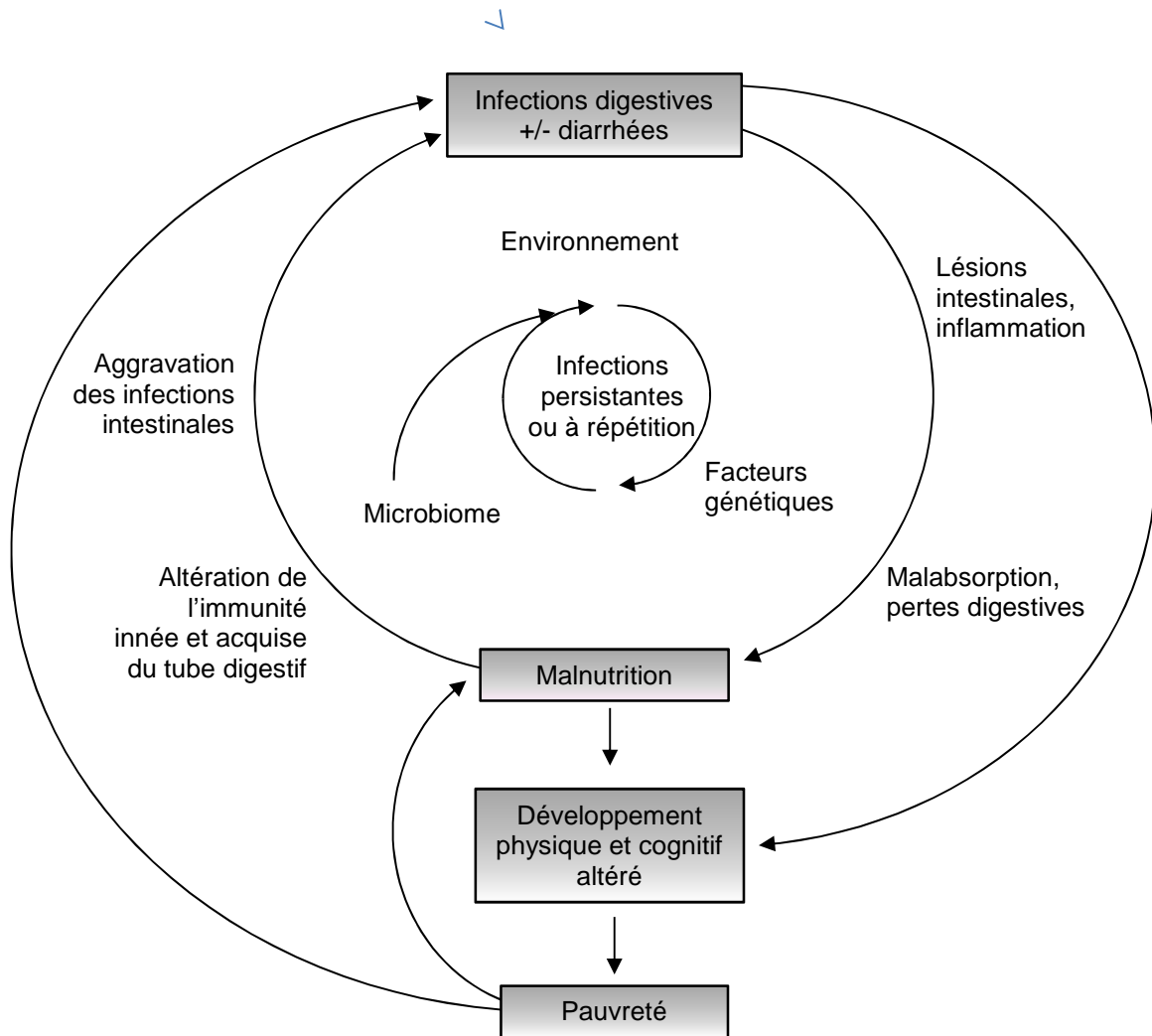


Figure 12: Le cercle vicieux de la malnutrition et des infections digestives.

(D'après Guerrant R. L. et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol ,2012).

Les conséquences du type de malnutrition sur le système immunitaire sont assez floues. On considérait que la dénutrition de manière globale provoque un effondrement progressif complet et désordonné du système immunitaire ; mais des mécanismes physiopathologiques précis commencent à être mis en évidence.^{107,112}

De même, la dénutrition est souvent considérée comme une seule pathologie dans les études alors qu'il existe des dénutritions avec des associations de carences en macronutriments et/ou micronutriments plus ou moins sévères et d'installation plus ou moins progressive.

Le caractère aigu ou chronique de la dénutrition pourrait également avoir un rôle variable dans l'installation d'une immunodépression secondaire. Enfin, rôle exact des agents infectieux responsables de diarrhées dans l'émergence de cette triade est également à explorer, même si des preuves ont été accumulées pour certains.²⁵

1.5.5. **Dénutrition et diarrhées de l'enfant à Madagascar**

Une récente étude menée par l'organisation non gouvernementale (ONG) « Action Contre la Faim » estime que 37,5 % des enfants de six à 60 mois souffrent de malnutrition chronique, dans la province de Tuléar (Sud-Ouest de Madagascar).¹¹³ Un taux de malnutrition aiguë globale (associant les malnutritions aiguës modérées et sévères) de 7,7 % classe cette province dans une « situation précaire » selon les critères de l'OMS.

Les diarrhées sont les morbidités parmi les plus fréquentes chez ces enfants toujours d'après cette étude. L'OMS considère d'ailleurs que la diarrhée est la troisième cause de décès chez les enfants malgaches de moins de cinq ans.¹¹⁴ De plus, les étiologies de diarrhées de l'enfant sont mal connues à Madagascar, comme le prouve l'étude R. Randremanana *et al.* où un agent pathogène n'était retrouvé que dans 54,6 % des cas.¹¹⁵

Dénutrition et diarrhées chez l'enfant sont donc des problèmes de santé publique à Madagascar. Les liens entre la dénutrition et la diarrhée doivent être éclaircis afin de proposer des mesures correctives adaptées au contexte malgache.

Partie 2:

MATERIEL ET METHODES

2.1. Démarche expérimentale générale

Les parasites intestinaux étudiés (cryptosporidies, *I. belli*, *C. cayetanensis*) et les microsporidies appartiennent respectivement au règne des protistes et des champignons. Toutefois, j'utiliserai par simplicité le terme « parasites opportunistes » (PO) pour mentionner l'ensemble microsporidies, cryptosporidies, *I. belli* et *C. cayetanensis*.

Une plateforme de diagnostic microscopique complète a d'abord été mise en place, la microscopie restant la référence pour les parasitoses intestinales opportunistes.

Des techniques de biologie moléculaire sont en cours de mise au point en parallèle, comprennent une qPCR Taqman® *Isospora Cyclospora*, des qPCR microsporidies et cryptosporidies ciblant chacune les espèces les plus fréquemment retrouvées. Ces qPCR sont destinées à de futures études épidémiologiques comme techniques de dépistage à grande échelle. Des techniques de typages d'espèces et de souches par séquençage sont en cours de mise en place pour les cryptosporidies et microsporidies. Aucun génotypage n'a été prévu sur *C. cayetanensis* et *I. belli*, ceux-ci n'étant que très peu soumis au polymorphisme génétique.^{39,51,55,116}

Deux études ont été lancées simultanément sur le portage des PO (Figure 13):

- Etude rétrospective « Opportunistes Moramanga » chez l'enfant diarrhéique malnutri chronique en milieu rural dans le district de Moramanga

- Etude prospective « Opportunistes Tsaralalana » chez l'enfant diarrhéique en état de malnutrition aiguë sévère à l'hôpital de Tsaralalana, à Antananarivo

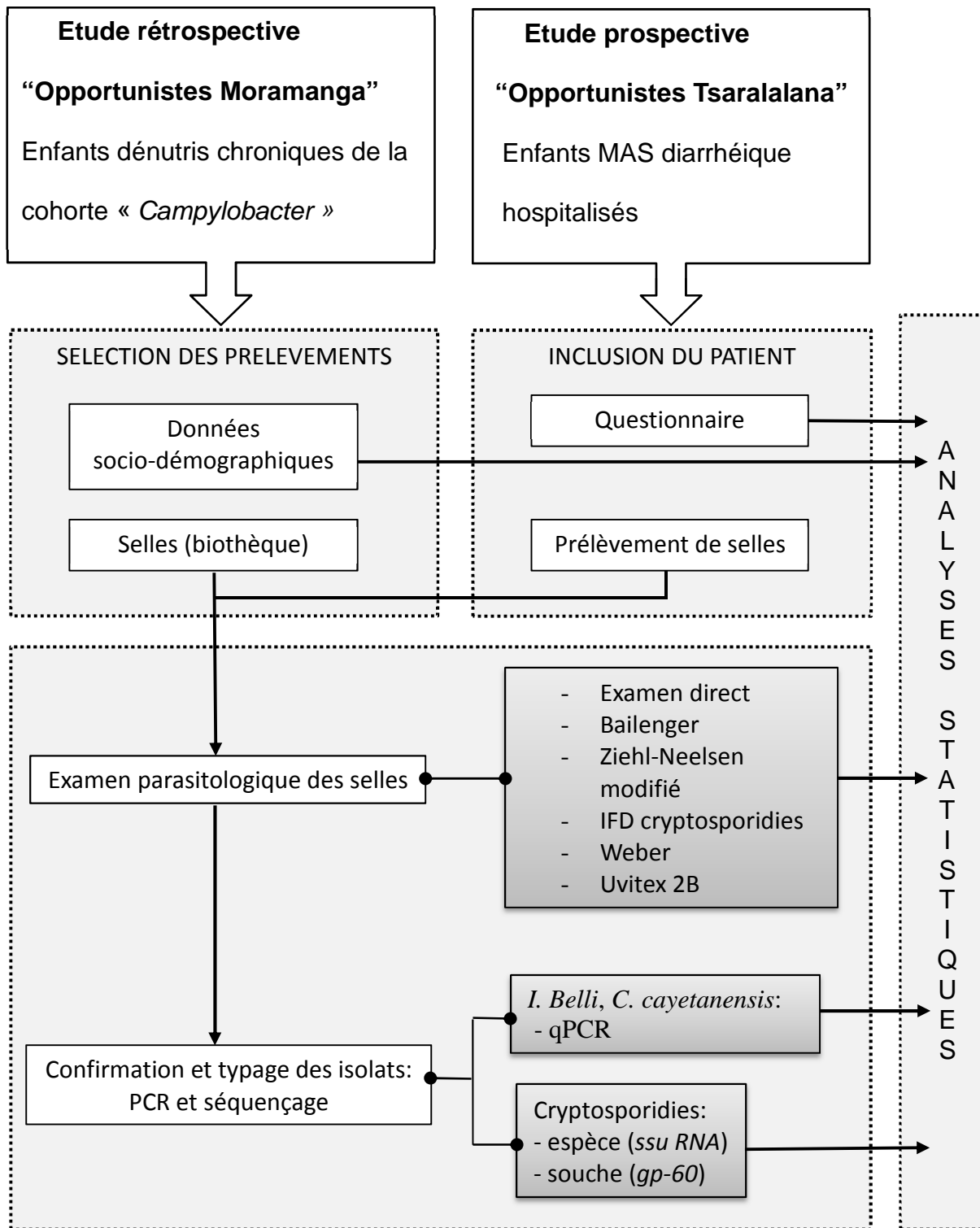


Figure 13: Démarche expérimentale générale des études épidémiologiques sur le portage des parasites opportunistes lancées par l’Institut Pasteur de Madagascar.

2.2. Etude rétrospective « Opportunistes Moramanga »

2.2.1. Objectifs de l'étude

Cette étude rétrospective avait pour objectif principal de mettre en évidence un risque accru de portage de PO chez l'enfant atteint de MC.

Les objectifs secondaires comprenaient une évaluation à titre « exploratoire » de la fréquence de portage de PO chez l'enfant en milieu rural, ainsi que la mise en évidence de facteurs de risques ou protecteurs associés à ce portage.

2.2.2. Population étudiée

Les sujets de l'étude « Opportunistes Moramanga » ont été inclus dans le cadre de la précédente étude de cohorte « *Campylobacter* » débutée en 2010 sur le portage de *Campylobacter* spp chez l'enfant lors de diarrhées. L'étude de cohorte a été réalisée en zone rurale, dans le district de Moramanga situé sur les hauts plateaux à 130 km à l'Est d'Antananarivo. Les lieux de l'étude comprenaient dix villages de la commune rurale d'Ambohibary (Ambohimanarivo, Ambohimiadana, Ambohinierenana, Ambohitranivo, Ambonidobo, Ampitambe, Ankazondandy, Antanambao, Befotsy, Beontsa). Cette commune rurale compte 17 811 habitants selon le recensement de 2003, essentiellement des paysans.

2.2.3. Etude de cohorte « *Campylobacter* »

L'étude de cohorte dynamique « *Campylobacter* » consistait en un suivi d'enfants de moins de 24 mois jusqu' à l'âge de 36 mois en zone rurale.

Pour chaque enfant, des données socio-démographiques, économiques et relatives à l'hygiène ont été collectées le jour de l'inclusion. Par la suite, un agent de santé communautaire était chargé de contacter les familles des sujets inclus deux fois par semaine et de signaler tout épisode diarrhéique. En cas de diarrhée en cours ou récente, le médecin de l'étude effectuait un examen clinique de l'enfant avec mesures anthropométriques, collectes de données complémentaires et réalisation d'un prélèvement de selles. Les selles recueillies étaient soumises dans cette étude à un examen direct à l'état frais pour la recherche de parasites ainsi qu'à la recherche de *Campylobacter* spp. Des aliquotes supplémentaires de selles étaient stockés à -80 °C en biothèque pour de futures analyses parasitologiques. Les données recueillies lors de cette étude sont détaillées dans l'annexe I.

Concernant les aspects éthiques, les parents ou tuteurs légaux ont été informés oralement des objectifs et modalités pratiques de cette étude pour leur enfant et ont signé un avis de consentement éclairé. Une prise en charge thérapeutique gratuite a été proposée pour chaque enfant diarrhéique inclus. Enfin le protocole de cette étude a été soumis au Comité d'Ethique de la Santé Publique de Madagascar et a reçu un avis favorable.

2.2.4. Sélection des sujets pour l'étude « Opportunistes Moramanga »

A partir de l'étude de cohorte « *Campylobacter* », des sujets ont été sélectionnés rétrospectivement pour l'étude « Opportunistes Moramanga » ; le but étant de réaliser une étude cas-témoin.

La sélection a été faite sur des critères précis d'inclusion associés à un tirage au sort. Les cas étaient des enfants diarrhéiques et malnutris chroniques (Z-score taille-âge ≤ -2) et les témoins des enfants diarrhéiques non malnutris de même tranche d'âge ($-2 < \text{Z-score taille-âge} \leq 2$). Ne pouvaient être inclus dans ce nouvel échantillonnage les enfants présentant un des critères d'exclusion explicités dans le (Tableau I). Les enfants de moins de trois mois ont été exclus du fait de leur faible probabilité d'infestation parasitaire et n'étant pas dans la période critique de diversification alimentaire. L'objectif principal de cette étude étant d'explorer le portage de parasites opportunistes en fonction de la malnutrition chronique, les états de MAS ont été exclus car pouvant fausser l'analyse. Les enfants ayant été traités par anti-infectieux dans les 48 h précédant le prélèvement n'ont pas été inclus en raison du risque de faux négatifs liés à une parasitose décapitée. Enfin, les parasites opportunistes pouvant être excrétés sur des périodes prolongées, un enfant ne devait être inclus qu'une seule fois pour ne pas augmenter artificiellement le nombre de prélèvements positifs. ^{7,39,52,117}

Tableau I: Critères d'exclusion des prélèvements de l'étude cas-témoin rétrospective « Opportunistes Moramanga ».

Âge < 3 mois ou âge > 36 mois

Etat de MAS

Valeurs anthropométriques aberrantes

Traitement antibiotique ou antiparasitaire 48 h avant le prélèvement

Refus de participation au cours de l'étude précédente

Enfant ayant déjà été inclus dans l'étude

2.2.5. **Analyses parasitologiques**

Pour chaque enfant inclus, une aliquote de selles a été décongelée de la biothèque pour analyses parasitologiques. Chaque selle était remise en suspension dans du sérum physiologique avant la réalisation de lames pour coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, trichrome et Uvitex 2B. L'absence d'effet significatif de la congélation à -80 °C sur la morphologie et le nombre de parasites visibles au microscope a été préalablement vérifiée sur une selle positive en microsporidies et en cryptosporidies laissée 15 jours au congélateur. Les prélèvements positifs en cryptosporidies étaient contrôlés par immunofluorescence directe (IFD) et ceux positifs à *C. cayetanensis* par autofluorescence UV. En parallèle, l'ADN a été extrait sur le reste du prélèvement. Pour les prélèvements positifs à cryptosporidies et microsporidies, des analyses de biologie moléculaire sont prévues afin de confirmer leur présence, déterminer les espèces en cause et les caractériser génétiquement. Les détails de ces techniques seront précisés dans les chapitres suivants.

2.2.6. **Analyses statistiques**

Les données obtenues ont été saisies sur des tableurs Excel puis analysées statistiquement à l'aide du site Internet BiostaTGV et du logiciel R 3.0.2. Les Z-scores de chaque enfant ont été préalablement calculés à l'aide du logiciel WHO Anthro 3.2.2. Les analyses univariées ont fait appel à des tests exacts de Fisher et/ou des tests de Chi-deux de Pearson pour les variables qualitatives et des tests de Student bilatéraux pour les variables quantitatives. Le seuil de signification retenu pour ces tests était de 5 %.

Les paramètres jugés intéressants d'après les données de la littérature et/ou présentant un $p < 0,30$ en analyse univariée ont servi à la conception d'une modélisation par régression logistique pour mesurer la force des associations. La vérification de l'hypothèse de log-linéarité des Z-scores a été réalisée préalablement à leur intégration au modèle. L'adéquation du modèle à l'échantillon a ensuite été évaluée par la réalisation de courbes ROC et le calcul de leur surface sous la courbe (AUC) où un modèle est considéré comme ajusté aux données si l'AUC dépasse 0,7. L'ajustement du modèle a été évalué par un test de Hosmer Lemeshow, avec pour seuil $p > 0,05$. L'écart entre les valeurs prédites et observées a été évalué par l'analyse des résidus via l'observation g des valeurs des résidus en fonction des quantiles théoriques ainsi que par la recherche d'un critère d'information d'Akaike minimal.

2.3. Etude prospective « Opportunistes Tsaralalana »

2.3.1. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la fréquence de portage de PO chez l'enfant diarrhéique atteint de MAS en milieu hospitalier.

Elle avait pour objectifs secondaires la recherche de paramètres anthropométriques ou de symptômes associés au portage de PO.

2.3.2. **Lieu de l'étude**

Une étude prospective du portage de parasites intestinaux chez les enfants diarrhéiques en état de MAS a été lancée en février 2012 à l'hôpital de Tsaralalana, à Antananarivo. L'hôpital Mère-Enfant de Tsaralalana est un établissement public de troisième niveau (75 lits) situé en centre-ville et accueillant des patients de conditions sociales variées. Environ 3500 patients âgés de 0 à 14 ans y sont admis chaque année, principalement pour infections respiratoires basses, suivies des diarrhées en deuxième cause. L'hôpital comprend parmi ses quatre unités un Centre de Récupération et d'Education Nutritionnelles Intensives (CRENI).

2.3.3. **Inclusion des sujets**

Les enfants ont été recrutés par les médecins et les internes du CRENI selon les critères suivants :

- âge inférieur à trois ans
- présence d'un épisode diarrhéique à selles non sanglantes
- état de MAS : selon les critères de l'OMS⁹³ pour les enfants de six mois et plus ; émaciation cliniquement patente, présence d'œdèmes de famine ou Z score poids-taille < -3 pour les enfants de moins de 6 mois⁹⁷
- étiologie de la diarrhée non connue

Un questionnaire concernant l'identification du patient, ses motifs d'hospitalisation, son état clinique, ses données anthropométriques et ses traitements était rempli et un prélèvement de selles réalisé.

Des prélèvements à titre « exploratoire » pouvaient être analysés chez des enfants avec des diarrhées persistantes et non atteints de MAS. Les analyses parasitologiques des selles étaient alors effectuées dans ces cas après discussion avec le médecin prescripteur et les résultats n'étaient pas inclus dans les analyses statistiques. Les examens ont été inclus dans la routine diagnostique du service gratuitement, alors que les examens complémentaires sont habituellement à la charge du patient. Ce protocole a été soumis et approuvé par le Comité d'Ethique du Ministère de la Santé Publique de Madagascar.

2.3.4. **Analyses parasitologiques**

Chaque prélèvement de selles a été soumis à une recherche de parasites par microscopie. Il comprenait un examen direct à l'état frais et après concentration de Baillenger ou de Ritchie et des colorations spécifiques réalisées à partir du culot de concentration (coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, coloration trichrome, coloration Uvitex 2B). Les prélèvements positifs à cryptosporidies et à *C. cayetanensis* ont été confirmés respectivement par IFD et par recherche d'autofluorescence UV. Les cryptosporidies isolées étaient génotypées afin d'identifier l'espèce en cause. Enfin, des qPCR ciblant *I. belli* et *C. cayetanensis* ont été réalisées sur l'ensemble des prélèvements.

2.3.5. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été saisies sur des tableurs Excel puis analysées statistiquement de manière similaire à l'étude « Opportunistes Moramanga » à l'aide du site Internet BiostaTGV et du logiciel R 3.0.2. Les Z-scores de chaque enfant ont été préalablement calculés à l'aide du logiciel WHO Anthro 3.2.2.

2.4. Analyses parasitologiques

Comme détaillé précédemment, les deux études « Opportunistes Moramanga » et « Opportunistes Tsaralalana » ont fait appel à des techniques de microscopie en première ligne, confirmées par biologie moléculaire.

2.4.1. Analyses microscopiques

Etant données les caractéristiques des parasites étudiés et la sensibilité moyenne des techniques de microscopie, plusieurs ont été combinées pour un examen parasitologique des selles complet. Toute selle a été soumise rapidement à un examen direct à l'état frais, avec ou sans addition de lugol ou de merthiolate-iode-formol (MIF). Une concentration parasitaire biphasique (technique de Baillenger ou de Ritchie) suivie d'un examen direct du culot de concentration a été réalisée uniquement pour les prélèvements issus de l'hôpital de Tsaralalana.¹¹⁸

Les parasites opportunistes ont ensuite été recherchés spécifiquement par des techniques largement documentées dans la littérature, dont les protocoles sont détaillés en annexe :¹¹⁹⁻¹²¹

- coloration de Ziehl-Neelsen modifiée pour la recherche de coccidies (annexe II)
- coloration trichrome ou technique de Weber et coloration fluorescente Uvitex 2B pour la recherche de microsporidies (annexes III et IV)
- confirmation de la présence de cryptosporidies par immunofluorescence directe (IFD), par le kit Merifluor® Cryptosporidium/Giardia de Meridian Biosciences suivant les instructions du fabricant,
- confirmation de la présence de *C. cayetanensis* par autofluorescence UV.¹²²

2.4.2. Biologie Moléculaire

2.4.2.1. Extraction d'ADN

Un protocole unique d'extraction des ADN parasites a été utilisé sur 200 µl de suspension de selle, pour toutes les PCR. L'extraction d'ADN a été réalisée sur selles non concentrées, congelées à - 80 °C avant leur analyse. Le broyage de la selle par billes d'aciers de 5 mm (QIAGEN) est effectué dans un tube Eppendorf de 1,5 ml avec le TissueLyser II de QIAGEN pendant trois minutes à la vitesse de 30 mouvements/seconde. Afin d'éviter un échauffement trop important du prélèvement, les supports du TissueLyser sont rafraîchis préalablement à 4 °C.

Le surnageant récupéré après sédimentation est additionné de 50 µl de PBS contenant 10 % de PolyVinylPolyPirrolidone (PVPP) et incubé dix minutes à 100 °C.^{49,123}

La suite de l'extraction fait appel au kit DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN. L'extrait est incubé deux heures minimum à 55 °C avec 20 µl de protéinase K à 600 mU/ml (QIAGEN, France) puis vortexé avant d'ajouter 130 µl de tampon AL (fourni dans le kit), vortexé à nouveau et incubé 10 min à 70°C. L'ADN est précipité par ajout de 400 µl d'éthanol absolu pour biologie moléculaire et le mélange vortexé. La suite de l'extraction est réalisée suivant les recommandations du fabricant. L'ADN extrait est élué sur un volume final de 200 µl et la qualité de l'extraction contrôlée au spectrophotomètre Nanodrop®.

2.4.2.2. **Mise au point d'une qPCR Taqman® *Isospora* - *Cyclospora***

Une qPCR Taqman® duplex a été conçue afin de pouvoir remplacer les techniques de microscopie en dépistage avec une meilleure sensibilité. La conception des amorces et de sondes à hydrolyse a été réalisée à l'aide de Primer Express® 3.0 (Applied Biosystems), en utilisant la base de données en ligne GenBank et le logiciel d'alignements SeaView 4 avec l'algorithme de calcul Muscle. La spécificité inter-espèce des amorces et sondes a été contrôlée *in silico* avec Basic Local Alignment Searching Tool (BLAST) et primer-BLAST. La complémentarité des sondes et amorces entre variants d'une même espèce a été évaluée par des alignements de séquences issues de GenBank. Les risques de formation d'homodimères, d'hétérodimères et d'auto-appariement en « épingle à cheveu » ont été estimés à l'aide de l'application en ligne Oligo Analyzer 3.1.

La PCR cible la région Internal Transcribed Spacer-2 (ITS-2) de la petite sous-unité ribosomale de *C. cayetanensis* (AF 303955.1) et d'*I. belli* (DQ060682.2). Les amorces pour *C. cayetanensis* (Cyclo ITS-2 forward ; Cyclo ITS-2 reverse) et *I. belli* (Iso ITS-2 forward ; Iso ITS-2 reverse) amplifient respectivement une séquence de 92 paires de bases et de 100 paires de bases (Tableau II).

Tableau II: Amorces et sondes de la PCR Taqman® duplex *Isospora-Cyclospora*.

Gène	Nom	Séquence
<i>ITS-2</i> de <i>C. cayetanensis</i>	Cyclo ITS-2 forward	CAAATACGGAGTGTGCTCTGTATATG
	Cyclo ITS-2 reverse	CGCCCTTCAACGAGATAATTG
	Cyclo ITS-2 probe	TAMRA-GCAACGACGCGGCAGTACAACCTCTCA-BHQ2
<i>ITS-2</i> d' <i>I. belli</i>	Iso ITS-2 forward	AGTCCGCACTGCAGCGATA
	Iso ITS-2 reverse	CAAGTGACGACCCCAATGG
	Iso ITS-2 probe	FAM-CACACATTTCATTCTCTCCCACTTGGTGG-BHQ1

Les amorces ont été préalablement testées en PCR quantitative (qPCR) avec un analogue du SYBR-green (Evagreen®) sur thermocycleur StepOne® Plus (Applied Biosystems). Le mélange réactionnel contient 5 µl de 5X Hot FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus de Solis Biodyne composé de l'enzyme Hot FIREPol® DNA Polymérase et de concentrations optimisées en désoxyribonucléotides triphosphates, tampons et chlorure de magnésium (MgCl). A ce mélange sont rajoutée chacune des amorces (concentration finale : 300 nM), 5 µl d'extrait d'ADN et de l'eau distillée pour préparations injectables avec pour volume final 25 µl par réaction.

Chaque réaction est réalisée au minimum en double dans des cupules fournies par le fabricant du thermocycleur (Applied Biosystems) selon le protocole suivant : 15 min à 95 °C pour activer la polymérase, 40 cycles de 15 sec à 95 °C, 1 min à 62 °C et 1 min à 65°C ; mesure de la courbe de dénaturati on de 60 °C à 95 °C.

2.4.2.3. Diagnostic d'espèce des cryptosporidies

La détermination d'espèce a été réalisée par séquençage à partir des produits de la PCR nichée mise au point par Xiao L. *et al.*³⁰

La première PCR est réalisée à partir de 5 µl d'extrait pour un volume total de 50 µl. Une séquence d'environ 1325 paires de bases sur le gène de l'ANRr 18S est amplifiée. Le mélange réactionnel contient 200 nM des amorces Crypto 18S F1 et Crypto 18S R1 (Tableau III), 2,5 U d'enzyme AmpliTaq® Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 6 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTP). Du tampon fourni par le kit de l'enzyme est aussi ajouté selon les préconisations du fabricant. Après 10 min d'activation à 95 °C, trente-cinq cycles d'amplification se déroulent de la manière suivante : 45 sec à 94 °C ; 45 sec à 55 °C ; 1 min à 72 °C. Une phase d'extension finale à 72 °C dure 7 min.

La seconde PCR est réalisée avec les amorces Crypto 18S F2 et Crypto 18S R2 (Tableau III) à partir de 5 µl du produit de la première PCR selon les mêmes conditions que précédemment, excepté la concentration en MgCl₂ à 3 mM. La séquence amplifiée a une longueur 820 paires de bases environ. Les produits de PCR sont purifiés par migration sur gel d'agarose 1% à 90 V pendant 80 min, suivi d'une purification des bandes excisées du gel par le kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel.

Les produits de PCR sont ensuite envoyés pour séquençage dans les deux sens à Beckman Coulter Genomics. Les résultats bruts du séquençage sont contrôlés, validés et interprétés avec l'aide de Seaview 4.3.5., BLAST, Bioinfo, et GenBank.

Tableau III: Amorces et sondes de la PCR nichée cryptosporidies pour le diagnostic d'espèce.

(D'après Xiao L. et *al.*, Appl. Environ. Microbiol., 1999)

Gène	Nom	Séquence
ARN ribosomal 18S	Crypto 18S F1	TTCTAGAGCTAATACATGCG
de <i>Cryptosporidium</i>	Crypto 18S R1	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA
	Crypto 18S F2	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
	Crypto 18S R2	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA

Partie 3:

RESULTATS

3.1. Etude « Opportunistes Moramanga »

3.1.1. Description générale de l'échantillon

L'échantillon initial de l'étude comprenait 144 prélèvements, mais l'analyse statistique a dû être réduite à 89 prélèvements (Figure 14). Huit prélèvements n'ont pas été retrouvés dans la biothèque. Des lames de microscope mal identifiées ou rendues illisibles par un montage inapproprié n'ont pas permis de contrôler les résultats de 26 prélèvements. Des enfants prélevés deux fois ont conduit à l'exclusion de 17 prélèvements. Enfin, des incohérences dans les valeurs anthropométriques et les données socio-démographiques ont nécessité l'exclusion de l'analyse de respectivement un et trois sujets.

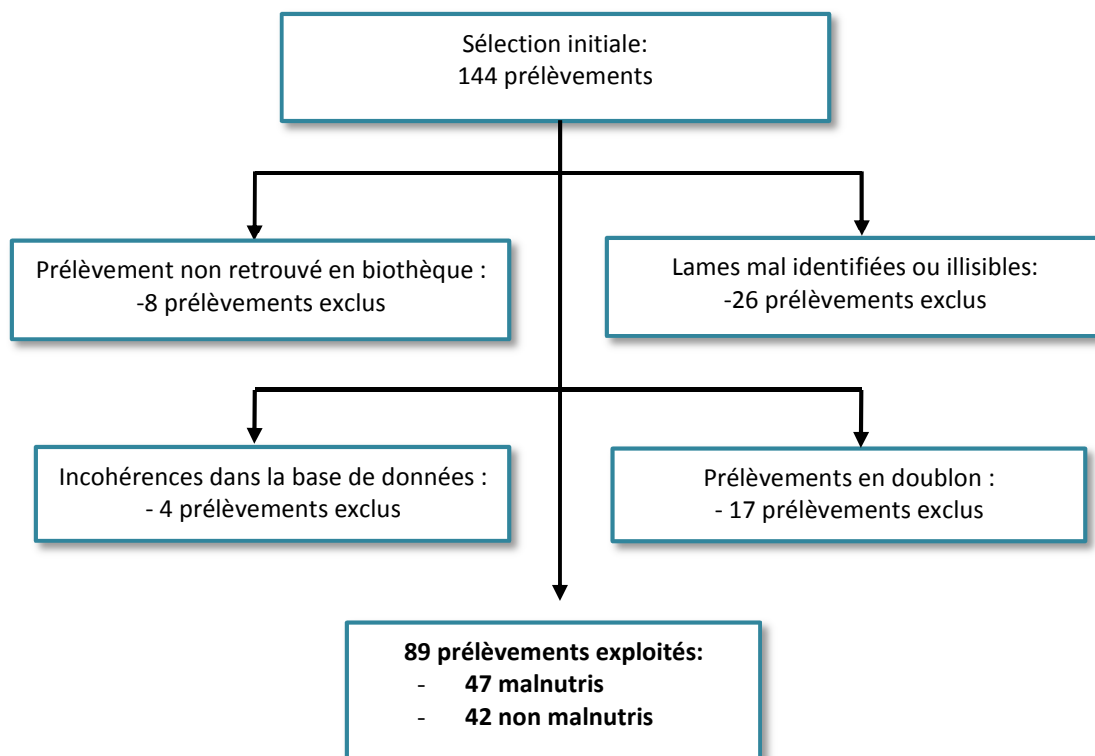


Figure 14: Organigramme du processus d'exclusion de prélèvements de l'étude « Opportunistes Moramanga ».

Selon les critères de l’OMS, 47 enfants sur 89 (52,8 %) étaient atteints de malnutrition chronique (MC) définie par un Z-score taille/âge < -2. Aucun n’était atteint de malnutrition aiguë (définie par un Z-score poids/taille < -2 ou périmètre brachial < 115 mm). Le sex-ratio de l’échantillon était de 1,07 sans différences de répartition entre les enfants malnutris chroniques et les enfants non malnutris (Tableau IV).

Tableau IV: Caractéristiques statistiques des données anthropométriques des sujets de l’étude « Opportunistes Moramanga ».

	Total (n=89)		MC (n=47)		non MC (n=42)		p-value
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	
Âge (mois)	14,8	9,2	16,7	9,1	12,9	9,1	0,054
Poids (kg)	8,5	1,7	9,1	1,8	7,8	1,3	0,615
Taille (cm)	71,4	8,7	71,3	9,3	71,9	8,4	0,405
IMC	16,6	1,6	16,9	1,6	16,5	1,5	0,213
PB (mm)	138,1	9,8	136,7	9,7	139,6	9,9	0,163
Z-score (P/T)	0	1,0	0	1,1	-0,1	0,9	0,149
Z-score (P/A)	-1,1	0,9	-1,5	0,7	-0,5	0,9	< 0,001
Z-score (T/A)	-1,9	1,3	-2,9	0,6	-0,8	1	< 0,001
Z-score (IMC/A)	0,2	0,9	0,4	0,9	-0,1	0,9	0,013

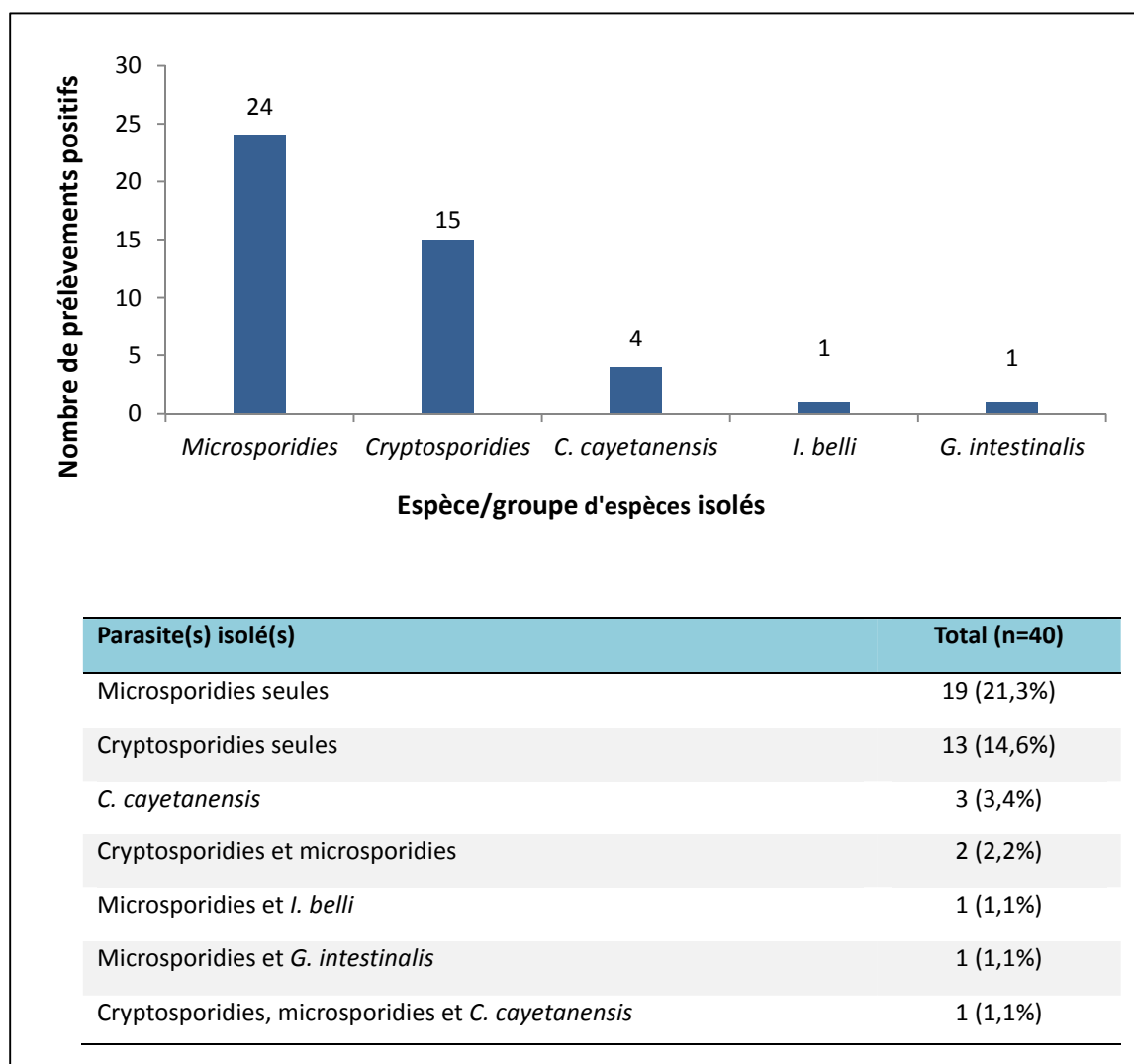
L’âge moyen des enfants de l’échantillon final était de 14,8 mois (1er quartiles: 7,4 ; 3ème quartile : 21,4 mois). On observait une hétérogénéité dans la répartition des âges des enfants entre les groupes malnutris chroniques (MC) et non malnutris chroniques (non MC), plus particulièrement lorsque l’on séparait chaque groupe en sous-classes d’âge inférieures ou supérieures à 10 mois ($p= 0,029$).

Concernant les données socio-démographiques, les personnes responsables de l'enfant étaient en premier lieu des femmes au foyer (29 ; 33%), suivies de cultivateurs/trices (20 ; 22%) et de tisserands (15 ; 17%). L'âge maternel moyen était de 28,5 ans (1^{er} quartile : 22 ans ; 3^{ème} quartile : 33 ans) avec un niveau scolaire maternel moyen de 4,2 années d'études (1^{er} quartile : 3 ans ; 3^{ème} quartile : 5 ans). Enfin la description statistique des autres données issues du questionnaire est détaillée dans l'annexe V.

3.1.2. **Description du portage digestif de parasites opportunistes**

Sur 89 selles analysées en microscopie, 40 (44,9%) sont positives avec au moins un PO présent (cryptosporidies ; microsporidies ; *I. belli* ; *C. cayetanensis*) (Tableau V). Les microsporidies et cryptosporidies sont présentes dans la grande majorité des cas, retrouvées respectivement dans 24 et 15 prélèvements positifs. Enfin, cinq prélèvements ont une co-infestation parasitaire. Les confirmations par biologie moléculaire n'ont pas encore été réalisées pour cette étude.

Tableau V: Résultats détaillés des analyses microscopiques des prélèvements de l'étude « Opportunistes Moramanga ».



3.1.3. Facteurs associés au portage de parasites opportunistes

Les tests de Student et tests de Chi-deux n'ont pas mis en évidence de différences significatives de valeur ou de répartition des paramètres anthropométriques entre le sous-groupe des enfants porteurs de PO (PO+) et le sous-groupe des enfants non porteur (PO-) (Tableau VI).

Tableau VI: Comparaisons des paramètres anthropométriques et socio-démographiques entre les sujets porteurs de PO et non porteurs de PO.

Paramètre	PO+ (n=40)	PO- (n=49)	p-value
Age moyen (mois)	14,0	15,6	0,416
Poids moyen (kg)	8,34	8,68	0,354
Taille moyenne (cm)	70,1	72,5	0,175
Périmètre brachial (mm)	137,2	138,8	0,428
IMC	17,0	16,4	0,076
Z-score (poids/taille) moyen	0,23	-0,12	0,090
Z-score (poids/âge) moyen	-1,03	-1,10	0,741
Z-score (taille/âge) moyen	-2,1	-1,73	0,187
MC (Z-score (taille/âge) < -2)	22	25	0,098
MC sévère (Z-score (taille/âge) < -3)	10	13	0,195
Z-score (IMC/ âge) moyen	0,35	-0,01	0,066
Z-score (IMC/ âge) < -1	2	8	0,09
Z-score (IMC/ âge) > 1	11	7	0,123
Nombre d'années d'études de la mère	4,0	4,5	0,289
Allaitement maternel	18 (19 NI)	14 (28 NI)	0,147
Sexe masculin	18	18	0,254
Facteurs environnementaux			
Sol du domicile salubre*	18 (3 NI)	39 (1 NI)	0,002
Usage de latrines	17 (3 NI)	34 (1 NI)	0,020
Usage de savon de toilette	20 (5 NI)	32 (1 NI)	0,376
Episode diarrhéique pendant la saison des pluies***	14	10	0,123

PO+ : Groupe des sujets porteur d'au moins un PO PO- : groupe des sujets non porteurs de PO
 NI : donnée sociodémographique manquante retirée de l'analyse

*: La salubrité du sol du domicile est définie par la présence de carrelage, parquet, ciment, vinyle, planches issues du commerce et exclut les sols en terre battue ou recouverts de végétaux ou de bois ramassé.

** : La conformité du stockage de l'eau es définie par la présence d'un récipient fermé par un bouchon.

*** : La saison des pluies débute le 1^{er} décembre et termine le 31 mars.

Des différences proches du seuil de significativité en analyses univariées entre les groupes PO+ et PO- ont toutefois été retrouvées pour les valeurs d'IMC ($p=0,076$), de Z-score (IMC/âge) ($p=0,066$) et de Z-score (poids/taille) ($p=0,090$) ainsi que pour la répartition des sujets MC sévère ($p=0,098$) (Tableau VI).

Les paramètres potentiellement corrélés en analyse univariée ($p < 0.30$), suspectés ou documentés dans la littérature comme pouvant influencer le portage de PO ont été intégrés et analysés dans des modèles de régression logistique avec interactions. L'évaluation des modèles intermédiaires a permis la création de nouveaux facteurs plus pertinents et notamment le paramètre « Usage de latrine hors saison des pluies ». Ce paramètre est considéré comme positif seulement si l'épisode diarrhéique survenait en dehors de la saison des pluies (entre le mois d'avril et le mois de décembre) chez un enfant dont la famille possédait une latrine. Un modèle final a été sélectionné en fonction de ses capacités prédictives (aire sous courbe ROC $> 0,7$; $p > 0,05$ en test de Hosmer Lemeshow) et de sa déviance des résidus prédits.

Le modèle final prédisant le portage de PO par régression logistique avec interactions comportait comme facteurs d'ajustement :

- le facteur « Usage de savon de toilette » interagissant avec le facteur « salubrité du sol du domicile ».
- Le facteur « niveau scolaire maternel » exprimé en années de scolarisations interagissant avec le facteur « possession d'au moins un zébu par le ménage »
- le facteur « Usage de latrines hors saison des pluies »

L'intégration de facteurs anthropométriques au modèle final n'a pas amélioré ses performances et n'a pas montré que les paramètres anthropométriques influencent positivement ou négativement le risque de portage de PO (Tableau VII). Le portage de PO n'est donc significativement lié à aucun paramètre anthropométrique que ce soit en analyse univariée ou multivariée.

En revanche, d'autres facteurs intégrés dans le modèle final ont été significativement associés à un risque de portage de PO (Tableau VII). Le facteur « Usage de latrines hors saison des pluies » ressort comme nettement protecteur que ce soit dans une régression logistique avec ou sans facteurs d'ajustement (sans ajustement : OR= 0,18; avec ajustement : OR= 0,18). Ce facteur associe un risque réduit de portage de PO chez les enfants ayant un épisode diarrhéique en dehors de la saison des pluies et dont les parents possèdent une latrine.

Il pourrait s'expliquer par le fait que les latrines en milieu rural à Madagascar sont souvent de conception sommaire et leurs fosses ne sont généralement pas étanches. La dissémination de parasites contenus dans les latrines vers les nappes phréatiques et cours d'eau serait donc possible en saison des pluies lorsque le sol est gorgé d'humidité et lessivé par les précipitations.

Tableau VII: Résultats de l'analyse par régression logistique des paramètres anthropométriques et environnementaux sur le portage de parasites opportunistes dans l'étude « Opportunistes Moramanga ».

Facteurs associés à un risque de portage de PO	Régression logistique			Régression logistique avec facteurs d'ajustement		
	OR	IC (95%)	p-value	OR	IC (95%)	p-value
Taille (cm)	0,97	0,92-1,01	0,177	-	-	-
IMC	1,43	1,08-1,93	0,075	1,36	0,92-2,10	0,131
Z-score (poids/taille)	1,46	0,95-2,33	0,090	1,60	0,88-3,09	0,135
Z-score (taille/âge)	0,80	0,57-1,10	0,179	-	-	-
Z-score (taille/âge) < -2	2,04	0,88-4,87	0,100	-	-	-
Z-score (taille/âge) < -3	1,88	0,72-5,00	0,198	-	-	-
Z-score (IMC/âge)	1,55	0,97-2,54	0,071	1,53	0,78-3,14	0,220
Z-score (IMC/âge) < -1	0,27	0,03-1,16	0,111	0,13	0,01-1,17	0,124
Z-score (IMC/âge) > 1	2,28	0,80-6,85	0,128	3,01	0,70-14,3	0,146
Usage de latrines hors saison des pluies	0,18	0,06-0,46	<0,001	0,18	0,04-0,66	0,014
Usage de savon de toilette et sol du domicile insalubre	0,06	0,009-0,30	0,001	0,04	0,003-0,31	0,005
Niveau scolaire maternel (ans) et possession d'au moins un zébu	-	-	-	0,52	0,25-0,95	0,044

OR : Odd Ratio du risque de portage de PO

L'étude de l'interaction des facteurs « sol du domicile salubre » et « usage de savon de toilette » a permis aussi de dégager un effet protecteur significatif de l'usage du savon de toilette contre le portage de parasites opportunistes dans le cas où le sol du domicile est insalubre. Plus clairement, les enfants vivant dans une maison dont le sol était en terre battue ou recouvert de végétaux (tapis en feuilles tressées par exemple) sont fortement protégés du portage de parasites opportunistes par l'utilisation de savon de toilette (sans ajustement : OR= 0,06 ; avec ajustement : OR= 0,04).

Enfin, le facteur prenant en compte le niveau scolaire maternel, seulement si le ménage possède au moins un zébu est associé à un risque réduit de portage de PO uniquement en régression logistique après ajustement (OR=0,52). En d'autres termes, dans les familles possédant au moins un zébu, le risque de portage de PO de l'enfant est inversement proportionnel au nombre d'années de scolarisation de la mère. Ce facteur pourrait évaluer le niveau socio-économique du foyer. En effet, le zébu en milieu rural à Madagascar peut être considéré comme un placement bancaire et la possession d'un zébu traduit donc une certaine aisance économique.¹²⁴

3.1.4. Facteurs associés au portage de microsporidies

Selon une méthodologie similaire à celle de l'analyse des facteurs associés au portage de PO, un modèle final de régression logistique prédisant le risque de portage de microsporidies comprenant sept facteurs indépendants a été sélectionné :

- Sol du domicile salubre,
- Usage de savon de toilette
- Usage de latrines hors saison des pluies
- Traitement de l'eau de boisson
- Promiscuité
- Niveau scolaire maternel
- MC sévère

Le facteur « traitement de l'eau de boisson » du modèle correspond à la pratique de désinfection systématique des eaux de boisson soit par ébullition, soit par chloration. Le facteur « promiscuité » est une valeur quantitative définie par le rapport nombre d'habitants/ nombre de pièces du domicile. Enfin, le facteur « MC sévère » est défini par un Z-score (taille-âge) inférieur à - 3.

Les tests univariés et le modèle de régression logistique (Tableau VIII) ont mis nettement en évidence la MC sévère comme un facteur associé à un risque de portage de microsporidies ($p= 0,038$ avec test de Chi-deux; OR= 12,6 en régression logistique avec facteurs d'ajustements). Les autres paramètres anthropométriques n'ont pas été significativement associés à un risque de portage de microsporidies.

La salubrité du sol du domicile a été fortement associée à une baisse du risque de portage de microsporidies ($p < 0,001$ avec test de Chi-deux ; $p= 0,001$ en régression logistique avec facteurs d'ajustements). Les facteurs « saison des pluies » (OR= 3,38) et « usage de latrines en dehors de la saison des pluies » (OR= 0) ont été respectivement positivement et négativement associés au portage de microsporidies, uniquement en régression logistique sans facteurs d'ajustements. De nombreux facteurs environnementaux interviennent également non significativement dans la régression logistique.

Tableau VIII: Résultats de l'analyse par régression logistique des facteurs associés à un risque de portage de microsporidies dans l'étude « Opportunistes Moramanga ».

Facteurs associés à un risque de portage de microsporidies	Régression logistique			Régression logistique après ajustement		
	OR	IC (95%)	p-value	OR	IC (95%)	p-value
Age de 10 à 24 mois	2,25	0,86-5,94	0,097	-	-	-
Z-score (taille/âge)	0,78	0,5-1,12	0,197	0,58	0,29-1,05	0,102
Z-score (taille/âge) < -2	1,72	0,66-4,62	0,268	-	-	-
Z-score (taille/âge) < -3*	2,85	1,02-7,95	0,042	12,6	2,23-102	0,007
Z-score (IMC/âge)	1,31	0,79-2,24	0,301	1,83	0,80-4,63	0,168
Saison des pluies	3,38	1,3-9,41	0,018	-	-	-
Usage de latrines	0,57	0,21-1,54	0,269	-	-	-
Usage de latrines hors saison des pluies*	0,0	0,05-0,61	0,008	-	-	-
Usage de savon de toilette*	-	-	-	3,83	0,766-26,9	0,131
Traitement de l'eau de boisson*	0,36	0,11-1,14	0,077	0,17	0,02-1,07	0,070
Sol du domicile salubre*	0,12	0,04-0,34	<0,001	0,04	0,006-0,26	0,001

OR : Odd Ratio du risque de portage de microsporidies

*: Facteurs intervenant dans l'ajustement de la régression logistique

3.2. Etude « Opportunistes Tsaralalana »

3.2.1. Description générale de l'échantillon

Au total 44 enfants diarrhéiques ont pu être inclus à l'analyse. Initialement 51 enfants avaient été recrutés, mais six ont dû être exclus de l'étude suite à une mauvaise traçabilité des analyses parasitologiques et un en raison de valeurs anthropométriques aberrantes. L'âge moyen de cet échantillon est de 12,3 mois avec pour valeurs extrêmes 1,3 et 24 mois, avec 1,6 pour sex-ratio. Les motifs initiaux d'hospitalisation (Figure 15) pour ces enfants étaient généralement multiples, comprenant principalement des diarrhées ou des gastro-entérites (72,7% ; 32 en valeur absolue), suivi de déshydratations (59,1% ; 6), de malnutrition aiguë (27,2% ; 12). Enfin, cinq enfants (11,4%) avaient pour motif(s) d'hospitalisation une hyperthermie, des convulsions ou une toux persistante.

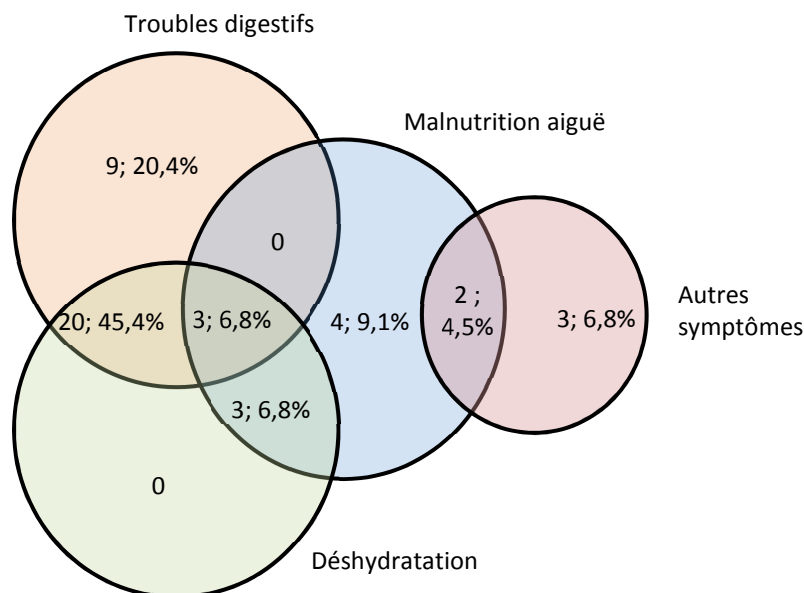


Figure 15: Motifs d'hospitalisation au CRENI des enfants de l'étude « Opportunistes Tsaralalana ».

Un état de MAS a été retrouvé chez 95,5 % (42 sur 44) des enfants (Tableau IX). Le diagnostic de MAS réalisé par le médecin n'a pas pu être confirmé rétrospectivement pour deux enfants en raison de l'absence de données anthropométriques. Trois enfants avaient moins de six mois et ont été considérés comme en état de MAS en raison de leur Z-score (poids-taille) < - 3 ou parce-que le médecin avait estimé que l'émaciation était sévère.

Tableau IX: Caractéristiques cliniques des cas de MAS de l'étude « Opportunistes Tsaralalana ».

Critères diagnostiques de MAS		Effectif (n=44)
Diagnostic non confirmé rétrospectivement		2
Enfants de plus de 6 mois	1 critère OMS	
	Œdèmes	5
	P/T Z-score < -3	11
	PB < 115 mm	2
	2 critères OMS	
	Œdèmes ; P/T Z-score < -3	3
	Œdèmes ; PB < 115 mm	0
	P/T Z-score < -3 ; PB < 115 mm	11
	3 critères OMS	7
Enfants de moins de 6 mois	P/T Z-score < -3	2
	Emaciation clinique	1

3.2.2. Fréquences de portage de parasites intestinaux

Sur les 44 selles analysées (Figure 16), 63,6 % étaient positives en microscopie, avec principalement la présence de levures en quantité anormale (52,3 % ; 23), suivies par la présence de microsporidies (20,5 % ; 9), de cryptosporidies (4,5 % ; 2) et de *Giardia intestinalis* (2,3 % ; 1).

Aucun autre protozoaire, ni d'œufs d'helminthes n'ont été observés au microscope dans ces prélèvements. Les cryptosporidies ont été confirmées et identifiées comme *C. hominis* par séquençage de la petite sous-unité ribosomale. La qPCR *Isospora* a été positive sur deux prélèvements (4,6 %) et la qPCR *Cyclospora* (2,3 %) sur un prélèvement, tous rendus négatifs en microscopie. Enfin, il faut noter que les selles positives à levures ou à microsporidies étaient souvent infestées également par d'autres parasites.

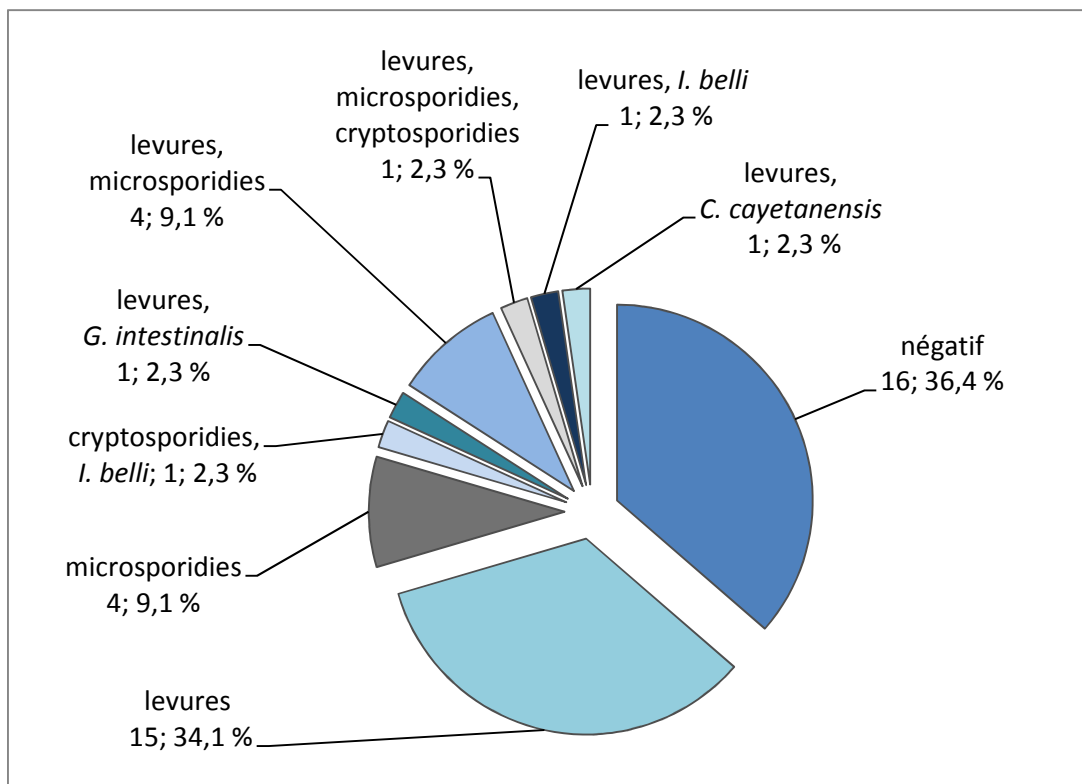


Figure 16: Résultats des analyses parasitologiques des selles de l'étude « Opportunistes Tsaralalana ».

3.2.3. Etude du portage de levure

Les résultats des analyses univariées ont mis en évidence des différences qui n'ont pu être confirmées en analyse multivariée. En effet, en raison du faible effectif de cette étude et du faible nombre de données recueillies par enfant, aucun modèle de régression logistique valide n'a pu mettre en évidence de facteurs associés au portage de levures. En analyse univariée seulement, des différences de répartition du portage de levures étaient observées entre les enfants ayant un périmètre brachial inférieur ou égal à 105 mm et les enfants ayant un périmètre brachial supérieur à 105 mm ($p= 0.013$), ainsi qu'entre les enfants présentant une anorexie ou non ($p= 0,037$).

3.2.4. Etude du portage de parasites opportunistes

Pareillement à l'étude du portage de levures, les analyses multivariées n'ont pas permis de dégager de facteur associé au portage de PO (cryptosporidies, *I. belli*, *C. cayetanensis*, microsporidies). En analyse univariée, une différence entre les porteurs et non porteurs de PO a uniquement été observée concernant la présence d'œdèmes bilatéraux ($p= 0,005$).

Partie 4 :
DISCUSSION

4.1. Considérations expérimentales

Ces deux études ont été complexes à mener à Madagascar et quelques approximations méthodologiques et expérimentales ont été inévitables. Les études « Opportunistes Moramanga » et « Opportunistes Tsaralalana » partent du postulat que les enfants malgaches sont plus sensibles aux infections parasitaires opportunistes du fait de la dénutrition et de ses conséquences sur le système immunitaire. Nous nous sommes intéressés dans ce travail principalement aux protozoaires digestifs retrouvés classiquement chez le sujet immunodéprimé atteint de SIDA. La recherche d'autres parasites intestinaux n'a pour autant pas été totalement négligée. Au minimum, un examen direct à l'état frais a été réalisé sur chaque prélèvement, mais les techniques diagnostiques de référence n'ont pas été utilisées pour les parasites autres que les microsporidies, cryptosporidies, *I. belli*, *C. cayetanensis*.

Cet aspect est d'autant plus important que l'on recommande en pratique clinique d'analyser trois prélèvements de selles avant de conclure à une absence de parasitose digestive alors que les sujets des deux études n'ont été prélevés qu'une seule fois. Le très faible nombre de cas de *G. intestinalis*, l'absence d'amibes et d'helminthes ne doivent donc pas être considérées comme représentatifs. Cette approximation est particulièrement importante pour l'étude « Opportunistes Moramanga » où un seul examen direct à l'état frais a été réalisé. Une analyse de tous les prélèvements par biologie moléculaire est d'ailleurs en cours pour *G. intestinalis* et *Entamoeba* sp.

De même, le fait de mentionner la présence de levures jugées en quantité anormale dans l'étude « Opportunistes Tsaralalana » est non seulement assez subjectif mais n'a qu'une très faible valeur scientifique, les espèces n'ayant pas pu être identifiées.

Ces deux études avaient pour objectif d'étudier le portage digestif de parasites chez l'enfant diarrhéique en état de dénutrition.

Elles ne peuvent confirmer avec certitude le rôle des parasites dans l'apparition de la diarrhée puisqu'un portage asymptomatique est possible.^{52,117} De plus dans l'état actuel des protocoles menés à Madagascar ainsi que pour des raisons éthiques, il n'a pas été possible d'explorer l'état immunitaire des sujets pour quantifier une éventuelle immunodépression. Enfin, le lien avec la dénutrition ne peut être affirmé ici puisque de nombreuses autres étiologies d'immunodépression pourraient favoriser l'apparition de parasitoses digestives opportunistes. L'une des étiologies les plus fréquentes en Afrique est l'infection par le VIH. Aucun dépistage du VIH n'avait été réalisé et les enfants inclus dans l'étude ont été considérés comme séronégatifs. Cette approximation s'appuyait sur les valeurs de séroprévalence globales à Madagascar estimées à 0,2-0,4 % qui nous ont fait considérer le VIH comme une cause négligeable d'immunosuppression, contrairement à d'autres pays d'Afrique.¹²⁵⁻¹²⁷

Nous étudions ici uniquement le portage parasitaire qui dans la littérature n'est pas toujours associé à des symptômes cliniques, particulièrement pour les microsporidies et *C. cayetanensis*.^{52,117}

De multiples autres examens biologiques ainsi qu'un questionnaire très approfondi auraient été nécessaires pour une exploration complète des étiologies de diarrhées et la présence d'autres causes infectieuses ou non infectieuses ne pouvait être exclue. La pertinence de tels questionnaires est souvent mise en défaut par le faible niveau socioculturel des responsables des enfants interrogés. En outre, le portage de ces parasites a été documenté sur un seul prélèvement par sujet sans estimation de la viabilité des parasites isolés. On ne peut donc exclure le passage passif à travers le tube digestif d'oocystes ou de spores non infectants issus de l'eau de boisson ou de l'alimentation.

Des biais dans la sélection des sujets des deux études sont potentiellement présents. L'étude « Opportunistes Moramanga » a été réalisée rétrospectivement à partir d'une étude de cohorte en milieu rural. Les études en milieu rural à Madagascar sont particulièrement difficiles à mener pour de multiples raisons, telles qu'un état civil des sujets inclus parfois imprécis, des réponses approximatives ou mensongères aux questionnaires liées à des incompréhensions ou des raisons culturelles. L'étude « Opportunistes Tsaralalana » a dû quant à elle faire face aux difficultés des médecins hospitaliers à inclure les enfants faute de temps, ce qui explique son effectif réduit.

La réalisation des analyses parasitologiques a fait aussi face à des difficultés techniques diverses. L'un des plus fréquents problèmes fut la faible quantité de selles disponible pour analyse. Dans le cas de l'étude « Opportunistes Moramanga », en raison de la quantité disponible les analyses microscopiques ont été réalisées sans concentration parasitaire et des lames de contrôle ne pouvaient être faites.

Toutefois, chaque lame de l'étude « Opportunistes Moramanga » a été lue deux fois au minimum pour les colorations de Ziehl-Neelsen modifiées et les colorations trichromes. Dans le cas de l'étude « Opportunistes Tsaralalana », tous les prélèvements analysés ont pu être contrôlés microscopiquement sur culot de concentration, mais la quantité de selles pour les concentrations parasitaires de Baillenger n'étaient pas toujours optimale.

Au cours de l'analyse des données, de nombreux prélèvements ont dû être exclus de l'étude « Opportunistes Moramanga », à cause de non-respect des critères d'inclusion dans l'étude (enfant ayant été inclus deux fois), de prélèvements non disponibles dans la biothèque, de lames mal identifiées ou encore de lames devenues illisibles. Ces problèmes ont réduit la puissance de l'étude, en conséquence il est fort probable que des caractéristiques importantes du portage de PO nous aient échappé.

La portée des analyses statistique de l'étude « Opportunistes Tsaralalana » a quant à elle été limitée par son effectif modeste, mais aussi par la faible quantité de données recueillie pour chaque enfant inclus.

4.2. Etude « Opportunistes Moramanga »

4.2.1. Fréquence des portages parasitaires

Pour la première fois (d'après les données disponibles), la présence de microsporidies, *I. belli*, *C. cayetanensis* a été confirmée à Madagascar. La présence de cryptosporidies, quant à elle, avait déjà été décrite par Areeshi *et al.* à Antananarivo.¹⁸ Cette étude est donc une des premières à fournir des connaissances épidémiologique de ces parasites à Madagascar.

Le pourcentage d'enfants diarrhéiques porteurs de parasites opportunistes était considérable (44,9 %), bien que des réserves existent vis-à-vis de la fiabilité des résultats, notamment en l'attente de confirmation des analyses microscopiques par la biologie moléculaire. On peut conclure que ces parasites sont fréquents à Madagascar, en particulier chez l'enfant en situation de malnutrition chronique en milieu rural ; leur prévalence restant à préciser. Cette étude doit donc être considérée comme exploratoire, mais elle a permis d'alerter les autorités sanitaires sur ce problème de santé publique.

Les microsporidies étaient les parasites intestinaux les plus fréquemment retrouvés (21,3 % des prélèvements). Ces résultats nécessitent d'être confirmés par biologie moléculaire, mais concordent avec des fréquences retrouvées en Afrique au cours d'autres études.^{71,72} Toutefois une réelle comparaison de la fréquence du portage des microsporidies avec les données de la littérature est difficile car le design de l'étude « Opportunistes Moramanga » est spécifique (étude cas-témoin, où les cas sont atteints de MC) et les populations étudiées dans les autres pays d'Afrique étaient essentiellement des sujets infectés par le VIH.

Les cryptosporidies ont été retrouvées dans 16,8 % des prélèvements, sous réserve d'être confirmées par biologie moléculaire. Toutefois, la comparaison avec les autres études sur le portage de cryptosporidies réalisées à Madagascar paraissait pertinente. En effet, les trois études réalisées sur le portage de cryptosporidies avaient été réalisées chez l'enfant diarrhéique de statut VIH présumé négatif. La fréquence du portage de cryptosporidies dans l'étude « Opportunistes Moramanga » paraissait beaucoup plus élevée que dans les études à Antananarivo, que ce soit dans l'étude « Opportunistes Tsaralalana » avec 4,6 % de positifs ou dans les travaux d'Areeshi *et al.* avec 5,6 % de positif.¹⁸

Cette différence pourrait s'expliquer par les lieux où ont été menées ces études. Il y aurait donc plus de cryptosporidies chez les enfants diarrhéiques dans la région rurale de Moramanga que dans la capitale Antananarivo, ce qui pourrait être lié au contexte de transmission (type de sol, proximité des animaux...). L'autre hypothèse possible serait une implication de la MC dans la hausse de la fréquence de portage de cryptosporidies. Cela n'a pas pu être prouvé comme nous le verrons dans la discussion des facteurs de risque associés au portage de parasites opportunistes. Quelle que soit l'hypothèse envisagée, ces résultats de fréquence de portage de cryptosporidies en milieu rural doivent être confirmés.

Les parasites *G. intestinalis*, *I. belli* et *C. cayetanensis* ont été rarement retrouvés dans l'étude « Opportunistes Moramanga ». Une sous-estimation du portage de *G. intestinalis* est fortement suspectée dans cette étude pour de multiples raisons : Un examen direct à l'état frais sans concentration parasitaire a seulement été réalisé dans notre étude et une fréquence de 12,6 % a été retrouvée au cours d'une étude récente de R. Randremanana *et al.* menée dans 14 zones de l'île et sur 2192 prélèvements d'enfants diarrhéiques âgés de moins de cinq ans.¹¹⁵ Une confirmation moléculaire de cette fréquence de *G. intestinalis* est en cours pour notre étude. Paradoxalement, aucun *C. cayetanensis*, ni d'*I. belli* n'ont été retrouvés lors étude de R. Randremanana *et al.*¹¹⁵ Ceci pourrait s'expliquer par le manque de formation des techniciens de laboratoires à l'identification de ces parasites intestinaux opportunistes. En effet, durant mes travaux à Madagascar, j'ai constaté que de nombreux techniciens malgaches ne connaissaient pas ces parasites et étaient incapables de les identifier au microscope.

Enfin d'autres espèces parasitaires n'ont selon toute vraisemblance pas été détectées dans les prélèvements de l'étude « Opportunistes Moramanga ». L'étude de R. Randremanana *et al.* a retrouvé 6,2 % de *Trichomonas intestinalis*, 2 % d'*Entamoeba histolytica* ainsi que de nombreux œufs d'*Ascaris lumbricoides*.¹¹⁵

4.2.2. Facteurs nutritionnels

Un risque accru de portage digestif de parasites opportunistes en situation de MC a pu être mis en évidence uniquement pour les microsporidies en cas de MC sévère (Z-score taille/âge < -3).

L'étude « Opportuniste Moramanga » étant une étude transversale, la chronologie de survenue de la MC et du portage de microsporidies n'a pas pu être déterminée.

La MC sévère pourrait occasionner chez l'enfant un état pathologique favorable au portage digestif de microsporidies. Inversement, un portage prolongé de microsporidies même asymptomatique ou pauci-symptomatique pourrait engendrer une malabsorption aggravant une MC sous-jacente. La réalité est probablement beaucoup plus complexe, où un cercle vicieux pourrait s'installer entre MC et microsporidies faisant intervenir aussi d'autres facteurs. Les liens entre malnutrition-diarrhées et microsporidies ont été très peu étudiés dans la littérature. Aucun modèle animal ou cellulaire n'a étudié l'influence de la dénutrition sur l'infestation par microsporidies. Seuls les travaux de Siobhan M. Mor *et al.* en Ouganda ont montré que les microsporidies étaient liés à des retard de prise de poids chez l'enfant ayant des diarrhées prolongées.⁷¹ Ce résultat sur l'influence de la MC sévère sur les microsporidies est donc nouveau et ne peut pour l'instant être étayé par d'autres données bibliographiques.

Il est à noter que l'implication des microsporidies dans les diarrhées reste discutée. Le portage asymptomatique de microsporidies chez des adultes sains a été démontré et leur rôle dans les diarrhées du sujet immunodéprimé est également largement reconnu ainsi que dans les diarrhées du voyageur et de l'enfant immunocompétent.^{66,68,69,83,117} Les microsporidies sont donc des pathogènes au caractère opportuniste très marqué et leur présence chez les enfants dénutris malgaches (étude « Opportunistes Moramanga ») pourraient simplement refléter une multiplication asymptomatique dans le tube digestif facilitée par la MC.

La diarrhée serait alors causée elle-même par un autre agent pathogène à identifier. Mais elles pourraient aussi être la vraie étiologie de ces diarrhées, ce qui reflète bien notre méconnaissance du caractère pathogène des microsporidies en dehors de contextes d'immunodépression sévère.

D'autres parasites ont été documentés comme étant lié à la dénutrition parmi lesquels *Cryptosporidium* spp et *G. intestinalis*, mais cette corrélation n'a pas été statistiquement confirmée dans l'étude « Opportunistes Moramanga ». Les raisons sont probablement un manque de puissance statistique lié à l'effectif trop petit de l'étude et un manque de sensibilité analytique des techniques diagnostiques utilisées particulièrement pour la recherche de *G. intestinalis*.^{24,25,128-130} D'autre part, une prévalence élevée de portage asymptomatique de ces parasites dans la population générale doit être envisagée et pourrait perturber l'interprétation de ces résultats.^{131,132}

4.2.3. Facteurs environnementaux

4.2.3.1. Usage de latrines

Des facteurs environnementaux complexes ont pu être mis en évidence dans l'étude « Opportuniste Moramanga ». L'usage de latrines pendant la saison sèche (d'avril à décembre) est apparu sans surprise comme un facteur protecteur du portage de parasites opportunistes. En revanche, l'analyse statistique a révélé que leur usage n'était plus protecteur pendant la saison des pluies. Cette observation, comme évoqué précédemment, pourrait s'expliquer par la conception artisanale des latrines qui ne sont généralement pas étanches.

En conséquence, les latrines pourraient contaminer des sources et cours d'eau avoisinants en saison des pluies lorsque les sols saturés d'humidité sont lessivés par les précipitations. Cette hypothèse peut paraître triviale, mais l'installation de toilettes conformes en complément d'autres mesures sanitaires a prouvé expérimentalement son efficacité sur les diarrhées dans des zones rurales au Kenya.¹³³ Certains auteurs considèrent aussi que l'installation de toilettes conformes et de systèmes d'épuration est essentielle pour lutter contre la dénutrition de l'enfant.¹¹¹ Un projet sur ce thème est justement en cours à Mahajanga (Nord-Ouest de Madagascar). L'étude « Opportunistes Moramanga » fournit donc clairement une piste prioritaire dans la prévention des parasites opportunistes et des autres agents pathogènes liés au péril fécal.

4.2.3.2. **Savon et sol insalubre**

L'usage du savon de toilette est ici un facteur protecteur uniquement dans le cas où le domicile familial avait un sol insalubre, c'est-à-dire en terre battue ou recouvert de végétaux. L'absence d'influence significative de l'usage de savon de toilette en dehors de ce cas particulier n'exclut absolument pas le rôle du savon. Elle pourrait là encore s'expliquer par un manque de puissance de l'étude, ou par un effet majoritaire de l'état du sol du domicile sur la transmission de ces parasites. Par ailleurs, la déclaration d'usage du savon de toilette par la mère doit être soumise à caution du fait du risque de surestimation de l'usage de savon. Il faut tenir en considération la honte que pourrait avoir une mère d'avouer à l'enquêteur qu'elle n'utilise pas de savon pour laver son enfant. Ce mésusage du savon pourrait être également lié au niveau d'éducation de la mère, comme l'état du sol pourrait être lié au niveau d'éducation du père et au niveau socio-économique de la famille.

Ces facteurs croisés restent cependant très intéressants car ils pourraient refléter l'influence du lavage des mains sur le portage de parasites opportunistes. En effet, les enfants de l'étude de Moramanga avaient 14,8 mois en moyenne, un âge correspondant à la période d'apprentissage de la marche. Ces enfants rampent et chutent souvent lors de leurs tentatives de marche, leurs mains entrant en contact avec le sol de nombreuses fois par jour. Un sol d'une propreté douteuse, d'autant plus s'il ne peut être lavé correctement est donc un vecteur important de parasites et ce d'autant plus si l'enfant n'est pas lavé avec du savon.

Salubrité du sol et usage de savon sont donc deux éléments qui paraissent fortement liés entre eux et là encore pourraient être intégrés comme des axes prioritaires pour l'amélioration des conditions sanitaires de la région rurale de Moramanga. Un sol salubre a été aussi fortement associé à une baisse du portage de microsporidies.

Cet aspect sous réserve de confirmation laisse enfin entrevoir des caractéristiques propres à l'épidémiologie des microsporidies. Ce facteur de risque n'avait à priori jamais été retrouvé pour les microsporidies dans la littérature, mais avait déjà été retrouvé sans lien à *C. cayetanensis*.⁶¹

4.2.3.3. Saison des pluies

La saison des pluies apparaît sans grande surprise en analyse univariée comme un facteur de risque dans l'étude « Opportunistes Moramanga », mais disparaît en analyse multivariée. Ce facteur avait déjà été observé pour le portage de cryptosporidies dans l'étude menée par Areeshi *et al.*¹⁸

De même, les données officielles de surveillance sanitaire ont montré qu'il y avait plus de cas de diarrhées pendant la saison des pluies et une étude cas-témoin menée par l'Institut Pasteur de Madagascar avait décrit les parasites intestinaux comme étant la première étiologie de diarrhées chez l'enfant de moins de cinq ans pendant cette même saison des pluies.¹¹⁵

La perte de significativité en analyse multivariée de ce paramètre comme facteur de risque de portage de parasites opportunistes laisse penser que la saison des pluies n'est qu'un révélateur des mauvaises pratiques d'hygiène et de lavages des sols des domiciles et/ou du mauvais état des équipements sanitaire dans cette zone étudiée. Néanmoins, dans des pays développés et équipés tels que la France ou l'Angleterre une « saisonnalité » des cryptosporidioses est observée.^{4,19} On peut donc penser qu'il existe un effet propre à la saison des pluies sur le portage de parasites opportunistes, qui n'a pas pu être détecté là encore faute d'un effectif suffisant.

4.2.3.4. L'hypothèse d'un réservoir animal

L'étude « Opportunistes Moramanga » n'a pas permis de détecter statistiquement un potentiel réservoir animal. Une autre limite de cette étude à propos des cryptosporidies et microsporidies est l'absence de génotypage des parasites isolés. Le génoypage aurait permis de confirmer les résultats des techniques microscopiques, d'étudier la diversité des espèces en circulation en milieu rural et de documenter un réservoir animal potentiel.

Néanmoins, un faisceau d'indices tend à prouver l'existence de réservoirs liés à la faune sauvage et au bétail.

Les enfants de l'étude « Opportunistes Moramanga » vivent dans des hameaux situés en bordure des forêts primaires du parc naturel d'Andasibe-Mantadia. Ce parc est mondialement connu pour ses nombreuses espèces animales endémiques de Madagascar.¹³⁴ Il pourrait donc exister des souches de parasites et/ou des réservoirs animaux spécifiques à Madagascar. Des données de différentes régions du monde ont déjà montré la diversité des réservoirs animaux pour les cryptosporidies et microsporidies pathogènes chez l'Homme.^{3,135} Słodkiewicz-Kowalska A *et al.* ont mis en évidence le portage d'*Encephalitozoon intestinalis* chez deux espèces de lémuriers (*Lemur catta*, *Varecia rubra*) en captivité en Pologne.¹³⁶ Très récemment, des cryptosporidies n'ayant pas encore été identifiées ont été retrouvées par Rasambainarivo FT *et al.* dans les fèces d'autres espèces de lémuriers (*Prolemur simus*, *Microcebus rufus*) dans le parc naturel de Ranomafana à Madagascar.¹³⁷ Ces données corroborent donc l'hypothèse d'un réservoir animal sauvage, mais aucune preuve de son existence effective ni de son rôle en santé humaine n'ont été apportées.

Le zébu (*Bos taurus indicus*) est un bovidé au cœur de la culture traditionnelle malgache. Il constitue non seulement un outil de travail, mais aussi un capital financier et son sacrifice a lieu traditionnellement à de nombreux événements (fêtes, mariages, cérémonies funéraires...).¹²⁴ De nombreux ménages en milieu rural possèdent donc un ou plusieurs zébus à Madagascar. Le nombre important de zébus et leur proximité avec l'Homme en font aussi un réservoir fortement probable. Le rôle

de réservoir que jouent les bovidés pour les cryptosporidies et notamment *C. parvum* et *C. pestis* n'est d'ailleurs plus à démontrer et a été largement documenté.^{3,7,138} Toutefois, aucune donnée n'est encore disponible sur le portage des cryptosporidies par les zébus à Madagascar.

Les réservoirs animaux de parasites opportunistes à Madagascar (faune sauvage et zébus) sont totalement hypothétiques mais pourraient constituer un élément expliquant les fréquences apparemment augmentées de parasites opportunistes en milieu rural par rapport à la capitale.

4.3. Etude « Opportunistes Tsaralalana »

Cette étude a permis d'évaluer la fréquence du portage de parasites chez les enfants diarrhéiques atteints de MAS dans le CRENI de l'hôpital de Tsaralalana. Il s'agit de la première étude explorant spécifiquement le portage de parasites intestinaux chez l'Enfant diarrhéique atteint de MAS à Madagascar. Cette population très spécifique n'a par ailleurs pas beaucoup été étudiée dans la littérature en dehors des cas d'enfants infectés par le VIH.¹³⁹⁻¹⁴¹

Les PO retrouvés ici permettent de confirmer les résultats de l'étude de Moramanga décrivant pour la première fois la présence de *C. cayetanensis*, d'*I. belli* et de microsporidies dans des selles humaines à Madagascar. Cependant, les fréquences de portage de PO doivent être confirmées à plus grande échelle, étant donné l'effectif limité de l'étude.

4.3.1. Portage digestif de levures

Des levures en quantité anormale ont été retrouvées dans 52,2 % des selles des enfants diarrhéiques atteints de MAS. Ce résultat soulève de nombreuses questions en dépit de sa pertinence mycologique discutable, comme cela a été développé précédemment. Ces données sont en accord avec de précédentes études qui ont montré que la dénutrition était un facteur de risque de colonisation à levures ou était statistiquement liée à une colonisation oropharyngée.^{142,143} A ce sujet, des candidoses oropharyngées étaient assez souvent cliniquement présentes chez les sujets inclus aux dires des médecins et internes du CRENI de l'hôpital de Tsaralalana.

En revanche, le caractère pathogène de cette colonisation à levures reste incertain. On pourrait considérer la présence de levures dans les selles comme une conséquence de la diarrhée et d'un déséquilibre de la flore intestinale, de manière assez similaire aux diarrhées post-antibiotique où le rôle des levures et particulièrement de *Candida* spp reste controversé.^{144,145} La colonisation à levures pourrait également être considérée comme la cause de la diarrhée en provoquant une inflammation locale et s'installant sur le terrain d'immunodépression de la MAS.^{146,147}

L'écologie fongique des levures en milieu hospitalier n'a pas été documentée à Madagascar. Aucune étude à grande échelle n'est disponible sur les espèces en circulation et leur profil de résistance.¹⁴⁸ L'émergence de souches résistantes aux antifongiques n'est pas à exclure, les médecins ayant prescrit de la nystatine et du fluconazole chez respectivement deux et quatre enfants de l'étude.¹⁴⁹

Des études à grande échelles sur les caractéristiques du portage de levures chez l'enfant en état de MAS sont donc nécessaires.

4.3.2. Portage de parasites opportunistes

Des PO ont été retrouvés chez 20,5 % des enfants de l'étude « Opportunistes Tsaralalana », soit beaucoup moins que dans l'étude « Opportunistes Moramanga » où 44,9 % des prélèvements étaient positifs. Comme nous l'avons discuté précédemment, cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'étude « Opportunistes Tsaralalana » a été conduite en milieu urbain.

Des cryptosporidies étaient présentes dans 4,5 % des selles, en adéquation avec les résultats de M. Areeshi *et al.* où une fréquence de 5,6 % avait été retrouvée également à Antananarivo.¹⁸ De même, l'étude « Opportunistes Tsaralalana » a identifié deux *C. hominis*, en accord avec les résultats de M. Areeshi *et al.* La présence de cryptosporidies dans la capitale est donc bien confirmée.

Le caractère pathologique du portage de cryptosporidies ne pouvait être ici démontré. Néanmoins on peut considérer les cryptosporidies comme responsables ou concourant à la diarrhée; étant donné l'état clinique critique des enfants de l'étude et les données de la littérature attestant de cryptosporidioses symptomatiques chez l'immunocompétent.^{7,16}

Les thérapies basés sur le nitazoxanide ont une efficacité prouvée sur la cryptosporidiose de l'enfant dénutri, mais ce médicament n'est pas encore disponible à Madagascar.³³ La distribution de ce médicament sur le territoire malgache est donc un élément indispensable pour l'amélioration de la prise en charge des diarrhées de l'enfant. En outre, le diagnostic de certitude de la cryptosporidiose est exclusivement biologique et fait appel à des techniques spécifiques qui n'ont pas été mises en place à Madagascar. Un renforcement de la formation des techniciens de laboratoire et des biologistes médicaux est nécessaire. L'utilisation dans les dispensaires et hôpitaux de tests rapides de détection d'antigènes de cryptosporidies dans les selles pourrait être une solution alternative, plus adaptée aux zones rurales d'accès difficile. La création d'un réseau de diagnostic et de surveillance des cas de cryptosporidiose serait aussi souhaitable. Enfin, l'ensemble des médecins malgaches doivent être sensibilisés à la cryptosporidiose comme étiologie de diarrhées chez l'enfant, ainsi qu'à son diagnostic et sa prise en charge spécifique.

Le portage de *C. cayetanensis* et d'*I. belli* dans l'étude « Opportunistes Tsaralalana » pose question car il a été documenté exclusivement par la PCR. Ces PCR ne sont pas encore validées pour le diagnostic de ces parasites et une réaction croisée ne peut être exclue. Néanmoins, un manque de sensibilité de la microscopie sur un seul prélèvement de selle est possible et a été documenté.^{39,55}

La signification pathologique de ce portage pose là encore question, mais étant donné la MAS et en accord avec les recommandations du site Internet du CDC, la présence de diarrhées associées à la mise en évidence du parasite implique de traiter systématiquement cette parasitose.

A ce sujet de manière similaire au diagnostic des cryptosporidies, des mesures doivent être mises en place pour sensibiliser le personnel médical à ces étiologies de diarrhées et leur prise en charge, ainsi que pour former le personnel de laboratoire au diagnostic de ces parasitoses. Cette sensibilisation serait d'autant plus efficace que le traitement de la cyclospore et de l'isosporose basé sur le cotrimoxazole est déjà largement disponible à Madagascar.

Les selles positives à microsporidies dans l'étude « Opportunistes Tsaralalana » sont en cours de confirmations par biologie moléculaire. La description des espèces retrouvées chez l'Homme à Madagascar est très attendue car rien n'a été encore publié à ce sujet. Le caractère pathologique des microsporidies est là encore discutable, comme dans l'étude « Opportunistes Moramanga ». Des études à grande échelle sont donc nécessaires pour évaluer le caractère pathologique des microsporidies dans les diarrhées en particulier chez les patients à haut risque de mortalité.

Les PO retrouvés dans l'étude « Opportunistes Tsaralalana » ne peuvent être incriminés dans la survenue de la diarrhée, leur présence doit toutefois être prise en compte étant donné le risque de mortalité associé à la MAS. Des études plus poussées sont donc nécessaires et ces résultats posent plus de questions qu'ils n'apportent de réponses.

4.3.3. **Malnutrition aiguë et immunodépression**

Au regard du portage de parasites et de levures fréquemment retrouvés dans l'étude « Opportunistes Tsaralalana », des similitudes apparaissent avec les infections opportunistes liées au VIH. La détermination de la séroprévalence VIH dans de prochaines études chez l'enfant diarrhéique sera nécessaire, malgré les données rassurantes concernant Madagascar.¹²⁵⁻¹²⁷ En effet, la malnutrition aiguë ou chronique chez l'enfant est souvent associée à l'infection par le VIH dans d'autres pays africains.^{150,151}

On pourrait également penser que les enfants en état de MAS ont une immunodépression similaire à celle induite par le VIH au niveau du tube digestif. Cependant, ni l'immunodépression, ni son étiologie n'ont été confirmées dans cette étude ; ces hypothèses restent donc purement spéculatives et doivent être explorées.

4.3.4. **Malnutrition aiguë et flore digestive**

De récentes découvertes sur le microbiome digestif chez l'enfant dénutri apportent un autre éclairage aux résultats de l'étude « Opportunistes Tsaralalana ». Une première étude, conduite par I. Trehan *et al.* a démontré les bénéfices d'un traitement antibiotique systématique chez les enfants atteints de MAS non compliquée en terme de récupération nutritionnelle et de mortalité.¹⁵² M. L. Smith *et al.* ont incriminé quant à eux le rôle du microbiome dans l'apparition du Kwarchiorkor.¹⁵³ Ces deux études sont les premières à mettre en évidence le rôle actif de la flore digestive dans l'apparition et le traitement de la MAS.

L'étude « Opportunistes Tsaralalana », bien que réalisée exclusivement chez des enfants diarrhéiques atteints de MAS, a retrouvé de nombreux pathogènes potentiels dans les selles. Ces pathogènes potentiels pourraient être la conséquence d'une flore digestive altérée, voire interagir positivement ou négativement avec celle-ci. L'interaction entre le microbiome et les organismes eucaryotes dans la flore digestive reste donc à explorer.

4.4. Perspectives

L'étude du portage des PO chez l'enfant dénutri est une thématique nouvelle de recherche à Madagascar où tout reste à faire. Les travaux débutés au cours de cette thèse sont poursuivis actuellement. Des qPCR et des techniques de séquençage pour les microsporidies et cryptosporidies sont en cours de mise au point. Un réseau de surveillance de fermes situées autour d'Antananarivo a été mis en place pour détecter des cas de cryptosporidiose chez le zébu. La culture de cryptosporidies sur cellules HCT-8 est aussi disponible, avec pour potentielles applications l'évaluation *in vitro* de l'activité anti-cryptosporidiale d'extraits de plantes malgaches.

Les résultats de ces travaux posent de nombreuses questions. La présence des cryptosporidies, microsporidies, d'*I. belli* et de *C. cayetanensis* a été confirmée à Madagascar mais leur fréquence n'a toujours pas été estimée à grande échelle. De même, les facteurs de risque environnementaux et nutritionnels de portage digestif de parasites doivent être confirmés. L'implication des microsporidies dans les diarrhées de l'enfant dénutri chronique doit être explorée en particulier.

Les génotypages des souches de cryptosporidies et microsporidies isolées jusqu'à présent sont aussi des résultats très attendus.

Comme le montre l'étude « Opportunistes Moramanga », le portage de Po intestinaux peut constituer un marqueur sanitaire pour les populations à risques et/ou défavorisées. L'étude du portage des PO peut donc s'intégrer dans des évaluations de l'efficacité de mesures sanitaires mises en place par le gouvernement malgache, par des organismes de coopération internationale ou par des ONG.

Enfin, l'exploration du portage parasitaire et fongique chez l'enfant atteint de MAS apparaît prometteuse. La signification clinique et le rôle physiopathologique du portage de ces parasites et levures doivent être étudiés pour faire évoluer si nécessaire les recommandations de prise en charge de l'enfant atteint de MAS.

CONCLUSION

L'objectif de ce travail était d'explorer l'épidémiologie du portage de parasites intestinaux opportunistes (cryptosporidies ; *I. belli* ; *C. cayetanensis*) et des microsporidies chez l'enfant dénutri à Madagascar. Les microsporidies, bien qu'appartenant au règne fongique ont été considérées dans ce travail comme des parasites opportunistes au regard de leurs caractéristiques physiopathologiques. Deux études préliminaires basées sur la microscopie des selles ont pu être réalisées : i) l'étude « Opportunistes Moramanga » comparant rétrospectivement le portage de parasites opportunistes chez l'enfant malnutri chronique et chez l'enfant ayant des caractéristiques anthropométriques normales dans la zone rurale de Moramanga ;

ii) l'étude prospective « Opportunistes Tsaralalana » chez l'enfant diarrhéique atteint de malnutrition aiguë sévère conduite dans un service de pédiatrie de l'hôpital de Tsaralalana, à Antananarivo.

Ces deux études ont non seulement confirmé la présence de parasites opportunistes à Madagascar, mais ont aussi révélé des fréquences importantes de portage digestif.

L'étude « Opportunistes Moramanga » incluant 89 enfants a mis en évidence la malnutrition chronique sévère (Z-score (taille/âge) < -3) comme un facteur associé au portage de microsporidies. Inversement, une réduction du risque de portage de microsporidies a été observée lorsque le sol du domicile était salubre, c'est-à-dire aisément lavable. Des facteurs environnementaux sont également protecteurs dans certaines conditions contre le portage de l'ensemble des parasites opportunistes, tels l'usage de savon de toilette ou la présence de latrines. L'usage de savon était en

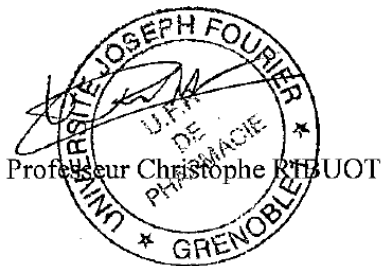
effet significativement protecteur lorsque le sol du domicile était insalubre. Les latrines limitaient le portage de parasites opportunistes seulement en dehors de la saison des pluies. La saison des pluies apparaît ici comme un facteur de risque soulignant le mauvais état des infrastructures sanitaires dans la zone rurale étudiée.

L'étude prospective « Opportunistes Tsaralalana » incluant 44 enfants a retrouvé des levures en quantité anormale et des parasites opportunistes dans de nombreuses selles. Ces résultats en cours de confirmation laissent penser que les parasites opportunistes digestifs et levures auraient un rôle prépondérant dans les diarrhées de l'enfant en état de malnutrition aiguë sévère.

Des confirmations par biologie moléculaire sont en cours, mais ces premiers résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la prise en charge des enfants diarrhéiques en état de malnutrition aiguë sévère ainsi que pour la lutte contre les diarrhées et la dénutrition de l'enfant à Madagascar.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 24/10/2013

LE DOYEN



LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Murielle CORNET

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Qi M, Wang R, Ning C, Li X, Zhang L, Jian F, et al. Cryptosporidium spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Exp. Parasitol.* août 2011;128(4):336-340.
2. Homem CG, Nakamura AA, Silva DC, Teixeira WFP, Coelho WMD, Meireles MV. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. *Parasitol. Res.* mai 2012;110(5):1741-1745.
3. Šlapeta J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology* [Internet]. [cité 4 sept 2013]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751913002026>
4. Chalmers RM, Elwin K, Thomas AL, Guy EC, Mason B. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveill.* [Internet]. 15 janv 2009;14(2).
5. Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Chalmers RM. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. *Epidemiol. Infect.* avr 2012;140(4):673-683.
6. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* janv 2010;124(1):80-89.
7. Chen X-M, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 30 mai 2002;346(22):1723-1731.
8. O'Hara SP, Chen X-M. The cell biology of cryptosporidium infection. *Microbes Infect.* août 2011;13(8-9):721-730.
9. Gormley FJ, Little CL, Chalmers RM, Rawal N, Adak GK. Zoonotic cryptosporidiosis from petting farms, England and Wales, 1992-2009. *Emerging Infect. Dis.* janv 2011; 17(1):151-152.
10. Cryptosporidiosis outbreak at a summer camp--North Carolina, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 15 juill 2011;60(27):918-922.
11. Hlavsa MC, Roberts VA, Anderson AR, Hill VR, Kahler AM, Orr M, et al. Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events

- associated with recreational water --- United States, 2007--2008. *MMWR Surveill Summ.* 23 sept 2011; 60(12):1-32.
12. Chalmers RM, Giles M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. *J. Appl. Microbiol.* nov 2010;109(5):1487-1497.
 13. ANOFEL Cryptosporidium National Network. Laboratory-based surveillance for Cryptosporidium in France, 2006-2009. *Euro Surveill.* 2010; 15(33):19642.
 14. Martín-Ampudia M, Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Mora L, Fernandez-Crehuet J. Under-notification of cryptosporidiosis by routine clinical and laboratory practices among non-hospitalised children with acute diarrhoea in Southern Spain. *Infection.* avr 2012;40(2):113-119.
 15. Calderaro A, Montecchini S, Gorrini C, Dettori G, Chezzi C. Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of Cryptosporidium spp. in a low-prevalence setting. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* mai 2011;70(1):72-77.
 16. Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, Rao JR, et al. Cryptosporidiosis in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2007;1(3):242-256.
 17. O'connor RM, Shaffie R, Kang G, Ward HD. Cryptosporidiosis in patients with HIV/AIDS. *AIDS.* 13 mars 2011;25(5):549-560.
 18. Areeshi M, Dove W, Papaventsis D, Gatei W, Combe P, Grosjean P, et al. Cryptosporidium species causing acute diarrhoea in children in Antananarivo, Madagascar. *Ann Trop Med Parasitol.* juin 2008;102(4):309-315.
 19. Laboratory-based surveillance for Cryptosporidium in France, 2006-2009. *Euro Surveill.* 2010;15(33):19642.
 20. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* janv 2004;17(1):72-97.
 21. Leitch GJ, He Q. Cryptosporidiosis-an overview. *J Biomed Res.* janv 2012;25(1):1-16.
 22. Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, Waithera T, et al. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* juill 2006;75(1):78-82.

23. Kirkpatrick BD, Haque R, Duggal P, Mondal D, Larsson C, Peterson K, et al. Association between *Cryptosporidium* infection and human leukocyte antigen class I and class II alleles. *J. Infect. Dis.* 1 févr 2008;197(3):474-478.
24. Checkley W, Epstein LD, Gilman RH, Black RE, Cabrera L, Sterling CR. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. *Am. J. Epidemiol.* 1 sept 1998;148(5):497-506.
25. Guerrant RL, Oriá RB, Moore SR, Oriá MOB, Lima AAM. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr. Rev.* sept 2008; 66(9):487-505.
26. Coutinho BP, Oriá RB, Vieira CMG, Sevilleja JEAD, Warren CA, Maciel JG, et al. *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. *J. Parasitol.* déc 2008;94(6):1225-1232.
27. Solórzano-Santos F, Penagos-Paniagua M, Meneses-Esquivel R, Miranda-Novales MG, Leaños-Miranda B, Angulo-González D, et al. [*Cryptosporidium parvum* infection in malnourished and non malnourished children without diarrhea in a Mexican rural population]. *Rev. Invest. Clin.* déc 2000;52(6):625-631.
28. El-Moamly AA-R, El-Sweify MA. ImmunoCard STAT! cartridge antigen detection assay compared to microplate enzyme immunoassay and modified Kinyoun's acid-fast staining technique for detection of *Cryptosporidium* in fecal specimens. *Parasitol. Res.* févr 2012;110(2):1037-1041.
29. Agnamey P, Sarfati C, Pinel C, Rabodonirina M, Kapel N, Dutoit E, et al. Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. *J. Clin. Microbiol.* avr 2011;49(4):1605-1607.
30. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl. Environ. Microbiol.* avr 1999;65(4):1578-1583.
31. CNHIM. Alinia 100 mg/5 ml, suspension buvable. theriaque.org;
32. Cabada MM, White AC Jr. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Curr. Opin. Infect. Dis.* oct 2010;23(5):494-499.
33. Amadi B, Mwiya M, Musuku J, Watuka A, Sianongo S, Ayoub A, et al. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2 nov 2002;360(9343):1375-1380.

34. Stachulski AV, Berry NG, Lilian Low AC, Moores SL, Row E, Warhurst DC, et al. Identification of isoflavone derivatives as effective anticryptosporidial agents in vitro and in vivo. *J. Med. Chem.* 23 févr 2006; 49(4):1450-1454.
35. Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Khalafalla RE, Desouky AY, Dauschies A. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitol. Res.* oct 2009;105(4):1155-1161.
36. Wu L, Jiang X, Shen Y, Lu Z, Tu G, Fu X, et al. Efficacy of ginkgolic acids against *Cryptosporidium andersoni* in cell culture. *Parasitol. Res.* nov 2011; 109(5):1475-1479.
37. Kim MJ, Kim WH, Jung H-C, Chai J-W, Chai J-Y. *Isospora belli* Infection with Chronic Diarrhea in an Alcoholic Patient. *Korean J Parasitol.* avr 2013;51(2):207-212.
38. Legua P, Seas C. *Cystoisospora* and *cyclospora*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* oct 2013; 26(5):479-483.
39. Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL. Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* janv 1997; 10(1):19-34.
40. Neira O P, Barthel M E, Wilson L G, Muñoz S N. [*Isospora belli* infection in HIV positive patients: report of two cases and literature review]. *Rev Chilena Infectol.* juin 2010;27(3):219-227.
41. Agnamey P, Djeddi D, Oukachbi Z, Totet A, Raccurt CP. *Cryptosporidium hominis* and *Isospora belli* diarrhea in travelers returning from West Africa. *J Travel Med.* avr 2010;17(2):141-142.
42. Meamar AR, Rezaian M, Mirzaei AZ, Zahabiun F, Faghihi AH, Oormazdi H, et al. Severe diarrhea due to *Isospora belli* in a patient with thymoma. *J Microbiol Immunol Infect.* déc 2009;42(6):526-529.
43. Guiguet M, Furco A, Tattevin P, Costagliola D, Molina J-M. HIV-associated *Isospora belli* infection: incidence and risk factors in the French Hospital Database on HIV. *HIV Med.* mars 2007;8(2):124-130.
44. Mariam ZT, Abebe G, Mulu A. Opportunistic and other intestinal parasitic infections in AIDS patients, HIV seropositive healthy carriers and HIV seronegative individuals in southwest Ethiopia. *East Afr J Public Health.* déc 2008;5(3):169-173.

45. Asma I, Johari S, Sim BLH, Lim YAL. How common is intestinal parasitism in HIV-infected patients in Malaysia? *Trop Biomed.* août 2011;28(2):400-410.
46. Walther Z, Topazian MD. Isospora cholangiopathy: case study with histologic characterization and molecular confirmation. *Hum. Pathol.* sept 2009;40(9):1342-1346.
47. Kochhar A, Saxena S, Malhotra VL, Deb M. Isospora belli infection in a malnourished child. *J Commun Dis.* juin 2007;39(2):141-143.
48. Ten Hove R-J, van Lieshout L, Brienen EAT, Perez MA, Verweij JJ. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Isospora belli* in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* juill 2008; 61(3):280-283.
49. Taniuchi M, Verweij JJ, Sethabutr O, Bodhidatta L, Garcia L, Maro A, et al. Multiplex polymerase chain reaction method to detect *Cyclospora*, *Cystoisospora*, and *Microsporidia* in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* déc 2011;71(4):386-390.
50. CDC. Cystoisosporiasis. DPDx Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern website.; 2010.
51. Shields JM, Olson BH. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int. J. Parasitol.* avr 2003;33(4):371-391.
52. Karanja RM, Gatei W, Wamae N. Cyclosporiasis: an emerging public health concern around the world and in Africa. *Afr Health Sci.* juin 2007;7(2):62-67.
53. Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin. Microbiol. Rev.* janv 2010; 23(1):218-234.
54. Shields JM, Lee MM, Murphy HR. Use of a common laboratory glassware detergent improves recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from lettuce, herbs and raspberries. *International Journal of Food Microbiology.* 1 févr 2012; 153(1-2):123-128.
55. Mansfield LS, Gajadhar AA. *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Vet. Parasitol.* 9 déc 2004;126(1-2):73-90.
56. Chacín-Bonilla L. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Trop.* sept 2010;115(3):181-193.
57. Mukhopadhyay C, Wilson G, Pradhan D, Shivananda PG. Intestinal protozoal infestation profile in persistent diarrhea in children below age 5 years in

- western Nepal. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* janv 2007;38(1):13-19.
58. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* sept 2009;103(9):892-898.
 59. Herwaldt BL, Beach MJ. The return of *Cyclospora* in 1997: another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported raspberries. *Cyclospora Working Group. Ann. Intern. Med.* 2 févr 1999;130(3):210-220.
 60. Bourée P, Lancon A, Bisaro F, Bonnot G. Six human cyclosporiasis: with general review. *J Egypt Soc Parasitol.* août 2007;37(2):349-360.
 61. Chacín-Bonilla L. [Importance of contact with soil in the transmission of cyclosporiasis]. *Invest Clin.* déc 2010;51(4):441-443.
 62. Berlin OG, Peter JB, Gagne C, Contreas CN, Ash LR. Autofluorescence and the detection of *Cyclospora* oocysts. *Emerging Infect. Dis.* mars 1998;4(1):127-128.
 63. Verweij JJ, Laeijendecker D, Brienen EAT, van Lieshout L, Polderman AM. Detection of *Cyclospora cayentanensis* in travellers returning from the tropics and subtropics using microscopy and real-time PCR. *Int. J. Med. Microbiol.* juin 2003;293(2-3):199-202.
 64. Capella-Gutiérrez S, Marcet-Houben M, Gabaldón T. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol.* 2012; 10:47.
 65. Anane S, Attouchi H, Kaouech E, Belhadj S, Ben Chaabane T, Ben Abdallah N, et al. [Epidemiological and clinical characteristics of intestinal microsporidiosis]. *Sante.* mars 2010;20(1):21-29.
 66. Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* sept 2010;34(8-9):450-464.
 67. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* 9 déc 2004; 126(1-2):145-166.
 68. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* oct 2011; 24(5):490-495.

69. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* oct 2006;19(5):485-492.
70. Bigliardi E, Sacchi L. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect.* avr 2001;3(5):373-379.
71. Mor SM, Tumwine JK, Naumova EN, Ndeezi G, Tzipori S. Microsporidiosis and malnutrition in children with persistent diarrhea, Uganda. *Emerging Infect. Dis.* janv 2009; 15(1):49-52.
72. Samie A, Obi CL, Tzipori S, Weiss LM, Guerrant RL. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* juin 2007;101(6):547-554.
73. Molina JM, Sarfati C, Beauvais B, Lémann M, Lesourd A, Ferchal F, et al. Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features. *J. Infect. Dis.* janv 1993; 167(1):217-221.
74. Derouin F, Gangneux JP. Changing patterns of disease and treatment of opportunistic parasitic infections in patients with AIDS. *Curr. Opin. Infect. Dis.* déc 1998;11(6):711-716.
75. Galván AL, Sánchez AMM, Valentín MAP, Henriques-Gil N, Izquierdo F, Fenoy S, et al. First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* avr 2011;49(4):1301-1306.
76. Masucci L, Graffeo R, Bani S, Bugli F, Boccia S, Nicolotti N, et al. Intestinal parasites isolated in a large teaching hospital, Italy, 1 May 2006 to 31 December 2008. *Euro Surveill.* [Internet]. 2011 [cité 21 juin 2012];16(24). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699767>
77. Lono A, Kumar S, Chye TT. Detection of microsporidia in local HIV-positive population in Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* juill 2011;105(7):409-413.
78. Zhang X, Wang Z, Su Y, Liang X, Sun X, Peng S, et al. Identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in China. *J. Clin. Microbiol.* mai 2011;49(5):2006-2008.
79. Ye J, Xiao L, Ma J, Guo M, Liu L, Feng Y. Anthroponotic enteric parasites in monkeys in public park, China. *Emerging Infect. Dis.* oct 2012;18(10):1640-1643.

80. Lallo MA, Calábria P, Milanelo L. Encephalitozoon and Enterocytozoon (Microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds: microsporidia spores in birds. *Vet. Parasitol.* 21 déc 2012; 190(3-4):418-422.
81. Słodkowicz-Kowalska A, Majewska AC, Trzesowska E, Skrzypczak Ł. Occurrence of Encephalitozoon intestinalis in the Red ruffed lemur (*Varecia rubra*) and the Ring-tailed lemur (*Lemur catta*) housed in the Poznan Zoological Garden, Poland. *Ann Parasitol.* 2012; 58(1):49-52.
82. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* juill 2005; 18(3):423-445.
83. Wichro E, Hoelzl D, Krause R, Bertha G, Reinthaler F, Wenisch C. Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* août 2005;73(2):285-287.
84. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N. Engl. J. Med.* 16 janv 1992; 326(3):161-166.
85. Van Gool T, Snijders F, Reiss P, Eeftinck Schattenkerk JK, van den Bergh Weerman MA, Bartelsman JF, et al. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J. Clin. Pathol.* août 1993;46(8):694-699.
86. Anane S, Kaouech E, Belhadj S, Abdelmalek R, Ammari L, Ben Othman T, et al. [Identification of Enterocytozoon bienewisi by PCR in stools of Tunisian immunocompromised patients]. *Pathol. Biol.* août 2011;59(4):234-239.
87. Valencáková A, Bálent P, Novotný F, Cisláková L. Application of specific primers in the diagnosis of Encephalitozoon spp. *Ann Agric Environ Med.* 2005;12(2):321-323.
88. Chabchoub N, Abdelmalek R, Issa S, Kanoun F, Ben Chaabene T, Bouratbine A, et al. [Contribution of PCR for detection and identification of intestinal microsporidia in HIV-infected patients]. *Pathol. Biol.* avr 2012;60(2):91-94.
89. Fedorko DP, Nelson NA, Cartwright CP. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. *J. Clin. Microbiol.* juill 1995;33(7):1739-1741.

90. Menotti J, Cassinat B, Sarfati C, Liguory O, Derouin F, Molina J-M. Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J. Clin. Microbiol.* avr 2003;41(4):1410-1413.
91. Verweij JJ, Ten Hove R, Brienen EAT, van Lieshout L. Multiplex detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* févr 2007;57(2):163-167.
92. Définitions□: malnutrition - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité le 21 août 2013]. Disponible sur: <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/malnutrition/48936>
93. WHO | WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children [Internet]. WHO. [cité 27 août 2013]. Disponible sur: <http://www.who.int/nutrition/publications/severemalnutrition/9789241598163/en/>
94. WHO | Training course and other tools [Internet]. WHO. [cité 27 août 2013]. Disponible sur: <http://www.who.int/childgrowth/training/en/>
95. Duggan MB. Anthropometry as a tool for measuring malnutrition: impact of the new WHO growth standards and reference. *Ann Trop Paediatr.* 2010; 30(1):1-17.
96. Manary MJ, Sandige HL. Management of acute moderate and severe childhood malnutrition. *BMJ.* 2008; 337:a2180.
97. UNICEF. Measuring malnutrition: individual assessment of acute malnutrition [Internet]. 2011 [cité 19 sept 2011]. Disponible sur: http://www.unicef.org/nutritioncluster/files/mod6_measuring_malnutrition-technical_notes.doc
98. Dewey KG, Begum K. Long-term consequences of stunting in early life. *Matern Child Nutr.* oct 2011;7 Suppl 3:5-18.
99. Ong KK, Hardy R, Shah I, Kuh D, National Survey of Health and Development Scientific and Data Collection Teams. Childhood stunting and mortality between 36 and 64 years: the British 1946 Birth Cohort Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* mai 2013;98(5):2070-2077.
100. WHO | Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination [Internet]. WHO. [cité 27 août 2013]. Disponible sur: http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/iodine_deficiency/9789241595827/en/index.html
101. WHO | Chapter 4 [Internet]. WHO. [cité 27 août 2013]. Disponible sur: <http://www.who.int/whr/2002/chapter4/en/index3.html>

102. WHO | Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005 [Internet]. WHO. [cité 27 août 2013]. Disponible sur: http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9789241596657/en/
103. Cole CR, Lifshitz F. Zinc nutrition and growth retardation. *Pediatr Endocrinol Rev.* juin 2008; 5(4):889-896.
104. Duggan C, Watkins JB, Walker WA. *Nutrition in Pediatrics: Basic Science, Clinical Applications.* PMPH-USA; 2008.
105. Emery PW. Metabolic changes in malnutrition. *Eye (Lond).* oct 2005;19(10):1029-1034.
106. Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc.* nov 2010; 69(4):636-643.
107. González-Torres C, González-Martínez H, Miliar A, Nájera O, Graniel J, Firo V, et al. Effect of malnutrition on the expression of cytokines involved in Th1 cell differentiation. *Nutrients.* févr 2013;5(2):579-593.
108. Cripps AW, Otczyk DC, Barker J, Lehmann D, Alpers MP. The relationship between undernutrition and humoral immune status in children with pneumonia in Papua New Guinea. *P N G Med J.* déc 2008;51(3-4):120-130.
109. Karimi M, Raee A, Baghianimoghadam B, Fallahzadeh MH. Vaccine-Induced Anti-HBs Level in 5-6 Year-Old Malnourished Children. *Hepat Mon.* févr 2013;13(2):e7048.
110. Richard SA, Black RE, Gilman RH, Guerrant RL, Kang G, Lanata CF, et al. Diarrhea in Early Childhood: Short-term Association With Weight and Long-term Association With Length. *Am. J. Epidemiol.* 1 oct 2013;178(7):1129-1138.
111. Humphrey JH. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. *The Lancet.* 19;374(9694):1032-1035.
112. Cunha MCR, Lima F da S, Vinolo MAR, Hastreiter A, Curi R, Borelli P, et al. Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e58872.
113. Action Against Hunger. Preliminary Results nutritional anthropometric and mortality SMART survey. Betioky Atsimo district, Madagascar; 2013 avr.

114. WHO. Madagascar: health profile. WHO; 2010.
115. Randremanana R, Randrianirina F, Gousseff M, Dubois N, Razafindratsimandresy R, Hariniana ER, et al. Case-Control Study of the Etiology of Infant Diarrheal Disease in 14 Districts in Madagascar. PLoS ONE. 17 sept 2012;7(9):e44533.
116. Sulaiman IM, Ortega Y, Simpson S, Kerdahi K. Genetic characterization of human-pathogenic *Cyclospora cayetanensis* parasites from three endemic regions at the 18S ribosomal RNA locus. Infection, Genetics and Evolution [Internet]. [cité 5 sept 2013]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813002803>
117. Sak B, Kváč M, Kučerová Z, Květoňová D, Saková K. Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. PLoS Negl Trop Dis. mai 2011;5(5):e1162.
118. BALENGER J, ANDRIEUX M, PAUTRIZEL R. [Comparative value of some analytical methods in human parasitic coprology]. Ann. Biol. Clin. (Paris). sept 1962;20:689-696.
119. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. Clin. Microbiol. Rev. oct 1994;7(4):426-461.
120. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol. déc 1995;33(12):3138-3145.
121. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J. Clin. Pathol. déc 1985;38(12):1337-1341.
122. Varea M, Clavel A, Doiz O, Castillo FJ, Rubio MC, Gómez-Lus R. Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts. Int. J. Parasitol. déc 1998;28(12):1881-1883.
123. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, van Rooyen MAA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J. Clin. Microbiol. mars 2004;42(3):1220-1223.
124. Lery F. Madagascar: les sortilèges de l'Île rouge. Editions L'Harmattan; 2002.
125. Frickmann H, Schwarz NG, Girmann M, Hagen RM, Poppert S, Crusius S, et al. Serological survey of HIV and syphilis in pregnant women in Madagascar. Trop. Med. Int. Health. janv 2013;18(1):35-39.

126. UNAIDS. Epidemiological factsheet [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/madagascar/>
127. Population Reference Bureau. Madagascar HIV/AIDS [Internet]. [cité 13 sept 2013]. Disponible sur: www.prb.org
128. Gendrel D, Treluyer JM, Richard-Lenoble D. Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fundam Clin Pharmacol.* avr 2003;17(2):189-197.
129. Bartelt LA, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, et al. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *J. Clin. Invest.* 3 juin 2013;123(6):2672-2684.
130. Verhagen LM, Incani RN, Franco CR, Ugarte A, Cadenas Y, Sierra Ruiz CI, et al. High Malnutrition Rate in Venezuelan Yanomami Compared to Warao Amerindians and Creoles: Significant Associations WITH Intestinal Parasites and Anemia. *PLoS ONE.* 2013; 8(10):e77581.
131. Ankarklev J, Hestvik E, Lebbad M, Lindh J, Kaddu-Mulindwa DH, Andersson JO, et al. Common coinfections of *Giardia intestinalis* and *Helicobacter pylori* in non-symptomatic Ugandan children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(8):e1780.
132. Davies AP, Campbell B, Evans MR, Bone A, Roche A, Chalmers RM. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United kingdom. *Pediatr. Infect. Dis. J.* sept 2009;28(9):838-840.
133. Garrett V, Ogutu P, Mabonga P, Ombeki S, Mwaki A, Aluoch G, et al. Diarrhoea prevention in a high-risk rural Kenyan population through point-of-use chlorination, safe water storage, sanitation, and rainwater harvesting. *Epidemiol. Infect.* nov 2008;136(11):1463-1471.
134. Goodman SM. Paysages naturels et biodiversité de Madagascar. Publications scientifiques du Muséum; 2008.
135. Dowle M, Hill NJ, Power ML. *Cryptosporidium* from a free-ranging marsupial host: Bandicoots in urban Australia. *Vet. Parasitol.* 15 nov 2013;198(1-2):197-200.
136. Słodkiewicz-Kowalska A, Majewska AC, Trzesowska E, Skrzypczak Ł. Occurrence of *Encephalitozoon intestinalis* in the Red ruffed lemur (*Varecia rubra*) and the Ring-tailed lemur (*Lemur catta*) housed in the Poznan Zoological Garden, Poland. *Ann Parasitol.* 2012; 58(1):49-52.
137. Rasambainarivo FT, Gillespie TR, Wright PC, Arsenault J, Villeneuve A, Lair S. Survey of *Giardia* and *Cryptosporidium* in lemurs from the Ranomafana National Park, Madagascar. *J. Wildl. Dis.* juill 2013;49(3):741-743.

138. Feng Y, Karna SR, Dearen TK, Singh DK, Adhikari LN, Shrestha A, et al. Common occurrence of a unique *Cryptosporidium ryanae* variant in zebu cattle and water buffaloes in the buffer zone of the Chitwan National Park, Nepal. *Vet. Parasitol.* 30 avr 2012;185(2-4):309-314.
139. Gendrel D, Richard-Lenoble D, Kombila M, Khayati A, Gendrel C, Nardou M, et al. [Intestinal parasitic colonization and protein-caloric malnutrition]. *Arch. Fr. Pediatr.* nov 1986;43(9):727-730.
140. Opintan JA, Newman MJ, Ayeh-Kumi PF, Affrim R, Gepi-Attee R, Sevilleja JEAD, et al. Pediatric Diarrhea in Southern Ghana: Etiology and Association with Intestinal Inflammation and Malnutrition. *Am J Trop Med Hyg.* 10 mai 2010;83(4):936-943.
141. Creek TL, Kim A, Lu L, Bowen A, Masunge J, Arvelo W, et al. Hospitalization and mortality among primarily nonbreastfed children during a large outbreak of diarrhea and malnutrition in Botswana, 2006. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* janv 2010;53(1):14-19.
142. Scheutz F, Matee MI, Simon E, Mwinula JH, Lyamuya EF, Msengi AE, et al. Association between carriage of oral yeasts, malnutrition and HIV-1 infection among Tanzanian children aged 18 months to 5 years. *Community Dent Oral Epidemiol.* juin 1997;25(3):193-198.
143. Gaitán-Cepeda LA, Sánchez-Vargas LO, Pavia-Ruz N, Muñoz-Hernández R, Villegas-Ham J, Caballos-Salobreña A. [Oral *Candida* in Mexican children with malnutrition, social marginalization, or HIV/AIDS]. *Rev. Panam. Salud Publica.* janv 2012;31(1):48-53.
144. Beaugerie L, Petit J-C. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* avr 2004;18(2):337-352.
145. Krause R, Reisinger EC. *Candida* and antibiotic-associated diarrhoea. *Clin. Microbiol. Infect.* janv 2005;11(1):1-2.
146. Kumamoto CA, Pierce JV. Immunosensing during colonization by *Candida albicans*: does it take a village to colonize the intestine? *Trends Microbiol.* juin 2011;19(6):263-267.
147. Kumamoto CA. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr Opin Microbiol.* août 2011;14(4):386-391.

148. Tietz H-J, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? *Mycoses*. 2001;44(11-12):437-45.
149. Fournier P, Schwebel C, Maubon D, Vesin A, Lebeau B, Foroni L, et al. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* déc 2011;66(12):2880-2886.
150. McDonald CM, Kupka R, Manji KP, Okuma J, Bosch RJ, Aboud S, et al. Predictors of stunting, wasting and underweight among Tanzanian children born to HIV-infected women. *Eur J Clin Nutr.* nov 2012;66(11):1265-1276.
151. Nhampossa T, Sigaúque B, Machevo S, Macete E, Alonso P, Bassat Q, et al. Severe malnutrition among children under the age of 5 years admitted to a rural district hospital in southern Mozambique. *Public Health Nutr.* sept 2013;16(9):1565-1574.
152. Trehan I, Goldbach HS, LaGrone LN, Meuli GJ, Wang RJ, Maleta KM, et al. Antibiotics as part of the management of severe acute malnutrition. *N. Engl. J. Med.* 31 janv 2013;368(5):425-435.
153. Smith MI, Yatsunenko T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*. 1 févr 2013;339(6119):548-554.

ANNEXES

Annexe I: Tableau récapitulatif des données recueillies dans l'étude de cohorte « *Campylobacter* » et ré-exploitées lors de l'étude cas-témoin « Opportunistes Moramanga »

Démographie	Date de naissance ; sexe ; hameau de résidence
Anthropométrie	Poids ; taille ; périmètre brachial ; présence d'oedèmes
Alimentation	Allaitement ; type d'allaitement (maternel, lait maternisé, autre lait)
Caractéristiques du logement	Nombre de pièces ; nombre d'habitants ; type de sol (carrelage, parquet, ciment, vinyl, planches achetées, terre ou sable, végétaux ou bois ramassés) ; type d'éclairage
Présence d'animaux	Animal domestique ; animal d'élevage (poule, oie, canard, pintade, lapin, zébu, porc, mouton, chèvre)
Niveau sanitaire du foyer	Présence de latrine ; utilisation de savon ; origine de l'eau de boisson (eau de surface, puit ou borne)
Niveau social maternel	Niveau scolaire de la mère ; années d'étude de la mère ; activité professionnelle de la mère ; âge de la mère
Hygiène de l'eau	Protection du stockage de l'eau de boisson (récipient ouvert, recouvert, bouché) ; traitement de l'eau de boisson (filtration à travers un linge ; filtration mécanique ; ébullition ; désinfection chimique ; décantation ; autre)
Analyses réalisées lors de l'étude de cohorte	Examen parasitologique à l'état frais ; Recherche de <i>Campylobacter</i> spp

Annexe II : Protocole de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée

MATERIELS ET REACTIFS

- Lames porte-objet
- Lamelles 24x60 mm
- Plaque chauffante
- Méthanol (*facilement inflammable, toxique*)
- Sèche-cheveux
- Fuchsine phéniquée (*toxique, corrosif*)
- Acide sulfurique 2% (*corrosif*)
- Vert de Malachite (*nocif*)
- Eukitt® (*toxique, irritant*)

CONTENU

- Mettre des gants
- Faire un frottis sur lame du culot de concentration de Bailenger de la selle ou de la biospie duodénale
- Sécher sur plaque chauffante à 37°C
- Fixer au méthanol au moins 8 minutes
- Sécher au sèche-cheveux sans chauffer les lames
- Recouvrir les lames de fuchsine phéniquée pendant 60 minutes
- Rincer à l'eau du robinet en dirigeant le jet sur le dos de la lame
- Décolorer 20-30 secondes à l'acide sulfurique 2% (temps de décoloration proportionnel à l'épaisseur du frottis. Pour des frottis très épais, des temps de décoloration plus longs peuvent être nécessaire).
- Rincer immédiatement à l'eau du robinet en dirigeant le jet sur le dos de la lame
- Recouvrir les lames de Vert de Malachite pendant 5 minutes
- Rincer à l'eau du robinet en dirigeant le jet sur le dos de la lame
- Laisser sécher à l'air libre ou au sèche-cheveux sans chauffer les lames
- Monter à l'Eukitt® et lire au microscope X40.

Annexe III : Protocole de coloration trichrome

MATERIELS ET REACTIFS

- Fiole jaugée
- Bécher
- Pipette graduée de 5 mL
- Chromotrope 2R en poudre
- Vert Lumière de haute pureté en poudre
- Acide phosphotungstique en poudre
- Acide acétique glacial (*inflammable, corrosif*)
- Eau distillée
- Flacon à bouchon à vis
- Papier aluminium
- Lames porte-objet
- Lamelles 24x60 mm
- Plaque chauffante
- Méthanol (*facilement inflammable, toxique*)
- Sèche-cheveux
- Alcool 90° (*inflammable*)
- Alcool absolu (*inflammable*)
- Eukitt® (*toxique, irritant*)

CONTENU

Pour environ 100 mL de colorant trichrome :

- Peser précisément :6,0 g de Chromotrope 2R ;0,15 g de Vert lumière haute pureté ;0,7 g d'acide phosphotungstique
- Diluer l'ensemble dans 3 mL d'acide acétique glacial
- Laisser reposer 30 min.
- Diluer dans 100 mL d'eau distillée en agitant à l'agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète des poudres.
- Mettre dans le flacon bouché à l'abri de la lumière (papier d'aluminium)
- Etiqueter en précisant la date de la préparation
- Stocker au réfrigérateur

- Préparer solution d'alcool acétique : 1mL d'acide acétique pour 200 mL d'alcool 90° et mettre dans un pot

- Faire 2 frottis minces à partir du culot de Bailanger ou faire un frottis de la muqueuse intestinale.
- Sécher les lames sur plaque chauffante
- Fixer au méthanol pendant 5 min
- Sécher au sèche-cheveux sans chauffer les lames
- Recouvrir les lames de trichrome pendant 90 min sans toucher les lames avec la pipette
- Rinçage rapide à l'eau du robinet en dirigeant le jet sur le dos de la lame
- Rincer 10 secondes dans le pot d'alcool acétique puis rincer rapidement avec une pissette d'alcool à 90°
- Passer 5 min dans pot d'alcool à 90°
- Passer 10 min dans pot d'alcool à absolu
- Sécher au sèche-cheveux sans chauffer les lames
- Monter les lames avec l'Eukitt®
- Lire au microscope à l'immersion x100

Annexe IV : protocole de coloration Uvitex 2B.

MATERIELS et REACTIFS

- Lames à bord rude
- Lamelles 24x60 mm
- Eukitt®
- Méthanol
- Flacon Uvitex 2B Uvibio® ou solution d'Uvitex 2B 0,25% (p/v) dans du PBS
- Flacon de Bleu d'Evans datant de moins de 2 mois
- Pissette d'eau distillée
- Cuve à coloration protégeant de la lumière

CONTENU

- Sur une lame, dessiner 2 cercles correspondant à la zone de dépôt au verso
- Déposer au recto de la lame environ 20 µl de suspension de selle dans les 2 zones, sans étaler
- Laisser sécher à température ambiante ou sur plaque chauffante à 35°C
- Recouvrir la lame de méthanol et fixer pendant 5 min
- Sécher le méthanol au sèche-cheveux sans chauffer la lame
- Déposer soigneusement une goutte d'Uvitex 2B sur chaque spot et laisser 5 min à l'obscurité
- Rincer doucement la lame avec la pissette d'eau distillée et déposer une goutte de Bleu d'Evans sur chaque spot
- Laisser incuber 5 min le Bleu d'Evans à l'obscurité et rincer doucement à la pissette d'eau distillée
- Essuyer le verso et les bords de la lame et sécher à l'air libre ou au sèche-cheveux en évitant l'exposition à la lumière
- Monter la lame sèche avec l'Eukitt®
- Stocker à l'abri de la lumière jusqu'à la lecture
- La lecture s'effectue au microscope à fluorescence sous lumière « bleue » à l'objectif x100.

Annexe V : Résumé des résultats des questionnaires socio-démographiques de l'étude « Opportunistes Moramanga ».

	Réponse positive	Réponse négative	Non renseigné
Conformité du sol du domicile*	30	55	4
Présence d'animal(ux) de compagnie	30	55	4
Présence d'animal(ux) d'élevage	22	63	4
Allaitement de l'enfant	32	10	47
Latrines	51	34	4
Usage de savon de toilette	52	31	6
Eau issue de puits ou borne	27	58	4
Stockage de l'eau de boisson dans un récipient bouché**	27	58	4
Traitement de l'eau de boisson	66	19	4
Traitement par ébullition	66	19	4
Traitement par chloration	3	82	4

* : La conformité du sol du domicile était définie par la couverture complète du sol par du carrelage, un parquet, du ciment, un revêtement vinyle ou des planches achetées.

** : Un stockage non conforme de l'eau de boisson comprenait le stockage dans un récipient protégé par un couvercle ou non protégé du tout.



Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Guillaume ROUX

Etude du portage digestif de parasites opportunistes chez l'enfant dénutri à Madagascar.

Résumé

Dénutrition et diarrhées sont deux problèmes de santé publique chez l'enfant à Madagascar. Les microsporidies, cryptosporidies, *Isospora belli* et *Cyclospora cayetanensis* sont des pathogènes retrouvés fréquemment lors de diarrhées du sujet immunodéprimé. La dénutrition pouvant induire une immunodépression relative, le but de ce travail était donc d'explorer le portage digestif de ces pathogènes opportunistes chez l'enfant dénutri.

Une première étude rétrospective a comparé le portage de parasites et de microsporidies chez l'enfant malnutri chronique et chez l'enfant ayant des caractéristiques anthropométriques normales dans la zone rurale de Moramanga. Une seconde a été conduite chez des enfants diarrhéiques atteints de malnutrition aiguë sévère dans un service de pédiatrie à Antananarivo.

Ces deux études ont non seulement confirmé la présence de ces pathogènes opportunistes à Madagascar, mais ont également révélé des fréquences importantes de portage digestif. Des facteurs nutritionnels et environnementaux ont pu être associés au portage de ces pathogènes dans l'étude en milieu rural. La malnutrition chronique sévère (Z-score (taille/âge) < -3) a ainsi été retrouvée comme un facteur associé au portage de microsporidies. L'étude menée en milieu hospitalier a mis en évidence dans de nombreuses selles des parasites opportunistes, mais également des levures en quantité anormale.

Des confirmations par biologie moléculaire sont en cours, mais ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la prise en charge des enfants diarrhéiques en état de malnutrition aiguë sévère ainsi que pour la lutte contre les diarrhées et la dénutrition de l'enfant à Madagascar.

Mots clefs : *Cryptosporidium* spp., *Isopora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, microsporidies, dénutrition, parasites opportunistes, diarrhées.