

**La microsporidiose intestinale: diagnostics réalisés au
laboratoire de Parasitologie-Mycologie de 1994 à 2013 et
étude des cas chez les transplantés rénaux du service de
Néphrologie du CHU de Rouen**

Delphine Dumortier

► **To cite this version:**

Delphine Dumortier. La microsporidiose intestinale: diagnostics réalisés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de 1994 à 2013 et étude des cas chez les transplantés rénaux du service de Néphrologie du CHU de Rouen. Sciences pharmaceutiques. 2015. <dumas-01232439>

HAL Id: dumas-01232439

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01232439>

Submitted on 23 Nov 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.

U.F.R DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

DE ROUEN

Année 2014-2015

N°

**THESE POUR LE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

DUMORTIER Delphine

Née le 27 décembre 1987 à ROUEN (76)

Présentée et soutenue publiquement le 7 juillet 2015

**La microsporidiose intestinale : diagnostics réalisés au
laboratoire de Parasitologie-Mycologie de 1994 à 2013
et étude des cas chez les transplantés rénaux du
service de Néphrologie du CHU de Rouen.**

Président du jury : Monsieur le Docteur Gilles GARGALA, MCU-PH, HDR

Membres du jury : Madame le Docteur Laetitia LE GOFF, MCU

Monsieur le Docteur Dominique BERTRAND, PH

Monsieur le Docteur Yann DULONDEL, Docteur en Pharmacie

Madame le Docteur Hanane DRIFI, Docteur en Pharmacie

Par délibération en date du 03 Mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse qui clos mes huit années d'études.

Je remercie le docteur Gilles Gargala d'avoir accepté de diriger ma thèse et d'être le président de mon jury de thèse. Je le remercie également pour sa patience et ses conseils avisés qui ont su m'orienter dans mon travail.

Je remercie le Docteur Laetitia Le Goff d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie le Docteur Dominique Bertrand d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir mis à ma disposition les dossiers cliniques des patients indispensables pour la réalisation de ma thèse.

Je remercie le Docteur Yann Dulondel de me faire le plaisir de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie le Docteur Hanane DRIFI d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'être une si bonne amie.

Je dédie cette thèse à mon père qui n'a pas eu le temps de voir l'aboutissement de son éducation. Je le remercie pour son soutien infaillible durant toutes mes années de scolarité, ses encouragements et son amour.

A ma mère

Pour son amour et son soutien dans les moments difficiles. Je la remercie également pour l'éducation que j'ai eu la chance de recevoir.

A ma sœur

Pour sa joie de vivre.

A Renaud

Pour sa présence et son soutien.

A mon cousin, Matthieu

Pour tous ces étés passés ensemble.

A ma famille

A mes beaux-parents

Pour m'avoir accueillie chaleureusement et soutenue.

A mes amis

Rencontrés à la fac, sans qui toutes ces années n'auraient pas eu la même saveur.

Ainsi que toutes les autres personnes que je n'ai pas citées.

U.F.R. DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Benoit VEBER

Professeur Pascal JOLY

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET - C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUITRANCOURT - M.BENOZIO- J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION -. DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER - J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R. LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P LEMOINE - Mle MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F. MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS - H.PIGUET - M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB - R.SOYER - B.TARDIF -.TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ - P.TRON - C.WINCKLER**

I. MEDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
M. Bruno BACHY (<i>surnombre</i>)	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>surnombre</i>)	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation

M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD (<i>surnombre</i>)	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN (<i>Surnombre</i>)	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Jean DOUCET	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
M. Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto – Gastro - Entérologie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie-Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mlle Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
M. Pierre FREGER	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
M. Philippe GRISE	HCN	Urologie
M. Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
M. Fabrice JARDIN	CB	Hématologie

M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
M. Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
M. Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN	ORL
M. Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
M. Pierre MICHEL	HCN	Hépatologie - Gastro - Entérologie
M. Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno MIHOUT (<i>surnombre</i>)	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves MILLIEZ	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
M. Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
M. Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
M. Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale

M. Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian PFISTER	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
M. François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe RICHARD	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace ROMAN	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatologie – Gastro
Mme Céline SAVOYE–COLLET	HCN	Imagerie médicale
M. Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mme Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
M. Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
M. Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. François TRON (Surnombre)	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	C.B	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
M. Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
M. Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
M. Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie Cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
M. Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
M. Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
M. Pierre-Hugues VIVIER	HCN	Imagerie Médicale

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR Anglais
Mme Cristina BADULESCU	UFR Communication

II. PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
Mr Paul MULDER	Sciences du médicament
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
M Jean-Marie VAUGEOIS (Délégation CNRS)	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique

Mlle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mlle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Roseline DUCLOS	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie Organique
M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mlle Marie-Laure GROULT	Botanique
M. Hervé HUE	Biophysique et Mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
M. Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEURS CONTRACTUELS

Mme Elizabeth DE PAOLIS	Anglais
Mr Thierry WABLE	Communication

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie MARTINET	Immunologie
----------------------------	-------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Imane EL MEOUCHE	Microbiologie
Mme Juliette GAUTIER	Pharmacie galénique
Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
M. Roland CAPRON	Biophysique
M Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation, Economie de la Santé
Mle Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
M. Jean-Louis PONS	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
M. Marc VASSE	Hématologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

III. MEDECINE GENERALE

PROFESSEURS

M. Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre **FAINSILBER** UFR Médecine générale

M. Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

M. Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

M. Serguei **FETISSOV** Physiologie (Groupe ADEN)

Mme Su **RUAN** Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil **ADRIOUCH** Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 1079)

Mme Carine **CLEREN** Neurosciences (Néovasc)

Mme Pascaline **GAILDRAT** Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

M. Antoine **OUVRARD-PASCAUD** Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mme Isabelle **TOURNIER** Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

Table des matières

Table des illustrations	17
Liste des abréviations.....	18
Introduction.....	19
1- Les microsporidioses intestinales [1]	20
1-1- Généralités	20
1-1-1- Taxonomie	20
1-1-2- Découverte	20
1-2- Morphologie	21
1-3- Cycle	22
1-4- Modes de transmission	25
1-5- Signes cliniques de la microsporidiose humaine	26
1-6- Physiopathologie	27
1-7- Réponse immunitaire vis-à-vis des microsporidies	27
1-7-1- Rôle de l'immunité humorale	27
1-7-2- Rôle de l'immunité cellulaire	28
1-7-2-1- Rôle des macrophages	28
1-7-2-2- Rôle des lymphocytes T CD4+ et CD8+	29
1-7-2-3- Rôle de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+	30
1-7-2-4- Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$	30
1-7-2-5- Rôle des cytokines	31
1-8- Facteurs de risque	32
1-9- Diagnostic	32
1-9-1- Techniques de coloration : recherche de spores	33
1-9-1-1- Techniques utilisant des colorants non fluorescents	33
1-9-1-2- Techniques utilisant des fluorochromes	34
1-9-2- Identification de l'espèce	34
1-9-2-1- Amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction)	35
1-9-2-2- Technique d'immunofluorescence directe utilisant des anticorps monoclonaux	36
1-9-2-3- Microscopie électronique	37
1-10- Traitements	37
1-10-1- Albendazole	37
1-10-2- Fumagilline	38
1-10-3- Nitazoxanide	39

1-10-4- Autres molécules	40
1-11- Prophylaxie	42
2- Analyse rétrospective des cas de microsporidiose intestinale diagnostiqués au laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Rouen de 1994 à 2013	43
2-1- Sélection des patients	43
2-2- Méthodes de diagnostic utilisées au CHU de Rouen	44
2-2-1- Prélèvements	44
2-2-2- Examen microscopique après coloration	45
2-2-2-1- Pour les biopsies	45
2-2-2-2- Pour les selles.....	45
2-3- Présentation des patients transplantés rénaux infectés par des microsporidies.....	48
2-4- Discussion	49
2-4-1- Limites de l'étude.....	49
2-4-2- Analyse des résultats	49
2-4-2-1- Concernant le groupe de patients inclus	49
2-4-2-2- Concernant le diagnostic	50
2-4-2-3- Concernant le traitement	51
2-4-2-4- Suivi de la maladie	51
Conclusion	53

Table des illustrations

Figure 1 - Représentation schématique d'une spore (forme infestante) de microsporidie [6]	21
Figure 2 - Décharge de la spore dans la cellule hôte [1]	23
Figure 3 - Cycle monocaryotique [1]	23
Figure 4 - Développement d' <i>Encephalitozoon intestinalis</i> dans l'épithélium intestinal [1]	24
Figure 5 - Développement d' <i>Enterocytozoon bieneusi</i> dans l'épithélium intestinal [1]	25
Figure 6 - Rôles des cellules T CD8+ cytotoxiques dans la réponse immunitaire contre la microsporidiose [15]	28
Figure 7 - Reconnaissance innée d' <i>Encephalitozoon</i> sp.par TLR2 sur les macrophages [15].....	28
Figure 8 - La réponse immunitaire à <i>Encephalitozoon cuniculi</i> [12]	32
Figure 9 - Spores de microsporidies dans un prélèvement de selles traitées par le trichrome de Weber modifié [6]	33
Figure 10 - Spores de microsporidies à l'Uvitex 2B grossissement 100 [6].....	34
Figure 11 - Spores d' <i>Encephalitozoon intestinalis</i> groupées dans vacuoles parasitophores marquées par un anticorps monoclonal (Immunofluorescence directe) [1]	36
Figure 12 - Nombre de cas de microsporidies diagnostiquées au laboratoire de Parasitologie du CHU de Rouen de novembre 1994 à mai 2013	44
Figure 13 - Microsporidies mise en évidence par l'Uvitex	45
Figure 14 - Microsporidies traitées par le trichrome de Weber modifié	46
Figure 15 - Microsporidies au grossissement x 400 par la technique de Van Gool (D. Leméteil).....	46
Figure 16 - Microsporidies au grossissement x 1000 par la technique de Van Gool (D. Leméteil).....	47
Figure 17 - Tableau regroupant les 5 cas diagnostiqués au service de néphrologie de Rouen de 1994 à 2013	48

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALAT : Alanine AminoTransférase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide RiboNucléique

ATU : Autorisation Temporaire d'utilisation

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

FDA : Food And Drug Administration

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

LT : Lymphocyte T

MetAP2 : Méthionine AminoPeptidase 2

MGG : May-Grünwald Giemsa

MPA : Acide Mycophénolique

NB : Nota Bene

NK : Natural Killer

NO : Monoxyde d'Azote

PCR : Polymerase Chain Reaction

PBS : Phosphate Buffer Saline

PFOR : Pyruvate Ferredoxine Oxydoréductase

RPM : Tours par minute

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Humaine Acquise

TLR2 : Toll-like Receptor 2

TNF : Tumor Necrosis Factor

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine

Introduction

La microsporidiose intestinale est une infection opportuniste qui fut identifiée chez l'homme lors de la pandémie de SIDA dans les années 1980. L'infection est causée par des microsporidies, microorganismes intracellulaires obligatoires. Cette infection est caractérisée par des manifestations intestinales à type de diarrhée, spontanément résolutive chez l'immunocompétent. Elle est responsable d'un tableau clinique bruyant et chronique chez les patients immunocompromis voire de formes disséminées et graves chez les patients très immunodéprimés. Elle est rencontrée principalement chez les patients atteints de déficit immunitaire acquis comme ceux infectés par le VIH (Virus de l'immunodépression Humaine) mais également comme les patients transplantés qui reçoivent des traitements médicamenteux anti-rejet de greffe. Pour les patients appartenant à la première catégorie et pouvant en bénéficier, l'efficacité des traitements anti-rétroviraux a pour conséquence une moindre susceptibilité à ces parasites en revanche, pour la seconde catégorie de patients, dont le nombre augmente constamment, ce sont essentiellement les traitements immunosuppresseurs dont ils bénéficient d'une part pour la réussite de la greffe qui les fragilise d'autre part vis-à-vis de ces pathogènes. L'infection, dont le diagnostic reste difficile, est souvent découverte tardivement car cette étiologie est souvent négligée lors du bilan biologique de première intention réalisé lors de l'apparition des troubles.

Dans la première partie de cette thèse, nous nous attacherons à décrire la microsporidiose intestinale, ainsi que les différents diagnostics existants et les traitements actuels. Dans la deuxième partie de ce travail, nous exposerons les résultats de l'étude des cas de microsporidiose intestinale diagnostiqués de 1994 à 2013 au laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Rouen.

1- Les microsporidioses intestinales [1]

1-1- Généralités

1-1-1- Taxonomie

Les microsporidies sont des organismes eucaryotes, longtemps considérées comme des protozoaires mais récemment classées parmi le règne des Mycètes (fungi), dans le phylum *Microspora*, dans la classe des *Microsporeae* et dans l'ordre des *Microsporidiae*. [1, 2, 3] En effet, certaines particularités de leur biologie cellulaire sont retrouvées chez les champignons (Weiss et Vossbrinck, 1999) comme l'appariement des noyaux en dicaryons chez certains genres, les mitoses fermées avec présence de plaques polaires semblables à celles des levures (Vavra, 1976 : Vivarès et al. 1977), la présence de tréhalose et de chitine dans la spore (Vavra, 1976). Les microsporidies seraient donc, soit une lignée qui aurait émergé des champignons, soit qui leur serait fortement apparentée. [4] Ce sont des organismes unicellulaires, intracellulaires obligatoires responsables d'infections intestinales chez l'Homme, surtout chez le sujet à compétence immunologique limitée. Ils sont ubiquitaires, en effet, de nombreuses personnes immunocompétentes présenteraient un portage occasionnel, transitoire, asymptomatique (non prouvé). [5]

Il existe environ 150 genres de microsporidies et plus de 1300 espèces mais seulement 8 genres sont retrouvés chez l'Homme, à savoir : *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*, *Brachiola*, *Nosema*, *Microsporidium*. Seuls 14 espèces sont pathogènes chez l'Homme, elles sont à l'origine de pathologies très différentes selon l'organe cible. [6]

La famille Enterocytozoonidae a été créée par Cali et Owen en 1990 pour l'espèce *Enterocytozoon bieneusi*. Le genre *Encephalitozoon* lui a été créé par Levaditi en 1923. [2] Dans cette thèse, on ne s'intéressera qu'à 2 espèces ayant un tropisme intestinal : *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis*. On décrira brièvement *Encephalitozoon cuniculi*, première espèce découverte chez les mammifères, car cette espèce est utilisée en recherche, pour les études sur les microsporidies. [10]

1-1-2- Découverte

Les microsporidies intestinales, inconnues auparavant, ont été découvertes lors de l'émergence de la pandémie de SIDA. En 1985, *Enterocytozoon bieneusi* fut isolé par Desportes-Livage *et al.* pour la première fois chez un immunodéprimé puis, en 1991, Orenstein et Cali ont décrit *Septata intestinalis* renommé *Encephalitozoon intestinalis* en 1995. [5, 7, 8]

Encephalitozoon cuniculi a été découverte chez les lapins en 1922. [10]

1-2- Morphologie

La classification des genres et espèces se base essentiellement sur les critères morphologiques :

- la taille des spores
- le nombre de tours de spires du filament polaire dans la spore
- l'existence ou non d'une membrane isolant le parasite lors de sa phase intracellulaire
- l'aspect disporoblastique (ne libérant que deux spores par cycle) ou pansporoblastiques (libérant de multiples spores)

Le genre *Enterocytozoon* et l'espèce *Encephalitozoon intestinalis* font parties du genre pansporoblastique. *Encephalitozoon intestinalis* se différencie par une vacuole parasitophore septée qui est en nid d'abeilles contrairement à *Enterocytozoon bieneusi* qui se développe directement au contact du cytoplasme de la cellule hôte. [5, 10] De plus, la spore d'*Encephalitozoon intestinalis* mesure 1,5 à 2 μm sur 1 à 1,2 μm avec cinq à sept tours de spire du filament polaire organisé en une seule rangée, plus grande que la spore d'*Enterocytozoon bieneusi*, 1 à 1,6 μm sur 0,8 à 1 μm , avec cinq à sept tours de spire du filament polaire organisé en deux rangées. [1, 10]

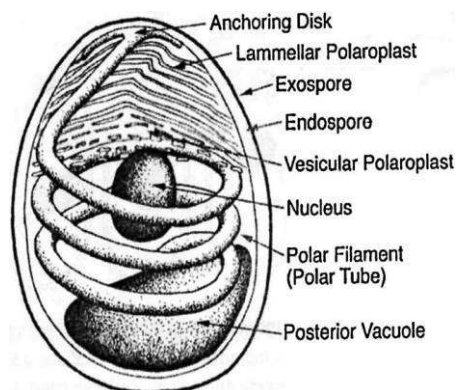


Figure 1 - Représentation schématique d'une spore (forme infestante) de microsporidie [6]

La paroi de la spore est composée de deux feuillets, l'endospore qui est en contact avec la membrane plasmique et l'exospore mise en évidence par microscopie électronique à transmission. [2, 4]

L'endospore a une épaisseur constante de 80 nm à l'exception de la région du capuchon polaire où vient s'ancrer le tube polaire, qui est plus fine d'environ une trentaine de nanomètres. Elle est riche en polysaccharides dont la chitine qui est le composé majoritaire, apparaissant fluorescente au microscope à fluorescence (fluorescence blanche à verte selon

le filtre utilisé), grâce à des fluorochromes tels que Calcofluor white M2R, Uvitex 2B, utiles au diagnostic. On retrouve également un réseau de fibrilles formant des ponts entre l'exospore et la membrane plasmique. L'hypothèse est que ces microfibrilles sont des filaments d' α -chitine interconnectés entre eux par l'intermédiaire de protéines pour former un réseau cohérent qui permet le maintien de la forme de la cellule. [4]

L'exospore a une épaisseur variable de 10 à 200 nm et se compose principalement de protéines. Son aspect est d'une grande variabilité selon le genre et l'espèce, ce qui fait de l'aspect de l'exospore un critère important d'identification. Chez le genre *Encephalitozoon*, l'exospore est formée de trois couches : la plus interne a une épaisseur de 15 nm environ, composée d'un réseau filamenteux ; la deuxième fait 2 à 3 nm d'épaisseur, constituée par des fibrilles parallèles de 4 nm formant une monocouche régulière d'aspect strié ; et la plus externe est composée de blocs d'aspect flocculeux, hérissés de spicules et espacés de manière régulière. Chez *Encephalitozoon intestinalis*, deux protéines pariétales ont été identifiées : la protéine SWP1 (Spore Wall Protein) de 50 KDa (Bohne *et al.*, 2000) et la protéine SWP2 de 150 KDa (Hayman *et al.*, 2001). [4]

Les rôles et fonctions de la paroi de la spore microsporidienne sont le maintien de la forme cellulaire grâce à la rigidité de la paroi, la résistance importante de la spore aux stress environnementaux (conservation du pouvoir infectieux durant plusieurs années à 4°C dans l'eau ou congelée jusqu'à -80°C et survie à pH acide ou basique plusieurs heures), l'adhésion/l'invasion de la cellule hôte. Chez *Encephalitozoon intestinalis*, les glycosaminoglycanes (gags) à la surface serviraient à l'adhésion à la cellule hôte. Au cours de la réponse immunitaire à médiation humorale, les anticorps reconnaissent les constituants les plus externes du champignon comme les protéines du tube polaire et de la paroi. [4]

La constitution cellulaire de la microsporidie est marquée par l'absence de mitochondrie et d'appareil de Golgi mais ce dernier est remplacé par une "fonction golgi", observée par l'activité de nucléoside diphosphatase et la glycosylation des protéines formant le tube polaire des spores. Elle est également formée d'un réticulum endoplasmique, de ribosomes libres, lysosomes, peroxyosomes, kinétosomes, d'hydrogénosomes. [2]

Encephalitozoon cuniculi est disporoblastique, mesure 1,5 μ m sur 0,5 μ m et possède une membrane parasitophore et aussi 6 spires du filament polaire. [5]

1-3- Cycle

Les 2 espèces étudiées sont parasites intracellulaires obligatoires de l'entérocyte.

Phase d'infestation de l'entérocyte :

La spore est la forme infestante des microsporidies. L'originalité du développement de la spore microsporidienne tient dans son dispositif d'expulsion du contenu infectieux dans

l'entérocyte. En effet, un filament nommé filament polaire, roulé en spirale dans la spore, se détend vers l'extérieur de la spore pour former un tube, reliant la spore à l'entérocyte. [1] Le redressement du tube polaire est un mécanisme, dépendant du calcium, déclenché par différents stimuli : variation du pH ou de l'osmolarité. Il est possible grâce au désassemblage de la kératine de l'exospore. Le sporoplasme ou stade infestant est expulsé dans le tube polaire par l'augmentation de la pression osmotique interne qui provoque un afflux d'eau dans la spore. [2]

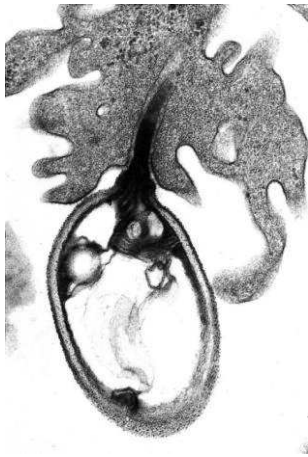


Figure 2 - Décharge de la spore dans la cellule hôte [1]

Cycle évolutif :

Il se déroule en 2 phases : la mérogonie, la phase proliférative durant laquelle se multiplient les mérontes issus de la division du sporoplasme. Durant le stade méronte, a lieu la gamétogonie c'est-à-dire la phase de reproduction sexuée où se forment les gamètes mâles et femelle. Puis, la sporogonie, autrement dit les processus conduisant à la formation des spores. La sécrétion d'une paroi signe le passage du méronte au sporonte. Dans le sporonte se forme le filament polaire. Ensuite, les sporontes se divisent en sporoblastes puis en spores. L'évolution en spore implique la sécrétion d'une paroi épaisse, très résistante. [1]

Les 2 espèces étudiées ont un cycle monocaryotique c'est-à-dire qu'elles se divisent par divisions binaires successives à partir d'un seul noyau. [1]

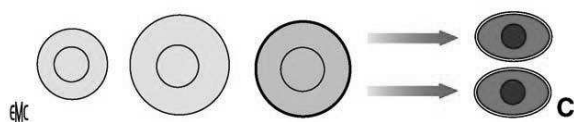


Figure 3 - Cycle monocaryotique [1]

Ce cycle comporte des variantes suivant l'espèce en présence.

Les variantes pour *Encephalitozoon intestinalis* :

Dès l'injection du sporoplasme dans l'entérocyte, il se forme une vacuole parasitophore qui est perméable aux nutriments et aux ions (pour permettre le métabolisme et la nutrition de la microsporidie), dans laquelle l'ensemble des stades de développement se déroulent. Dans cette vacuole, se trouve 2 à 4 mérontes qui se transforment en sporontes puis en sporoblastes par divisions binaires successives. La vacuole contient simultanément tous les stades de développement. Les spores matures sont libérées dans la lumière intestinale et le chorion. Ce dernier sert de relais pour la dissémination dans l'organisme. [1, 2]

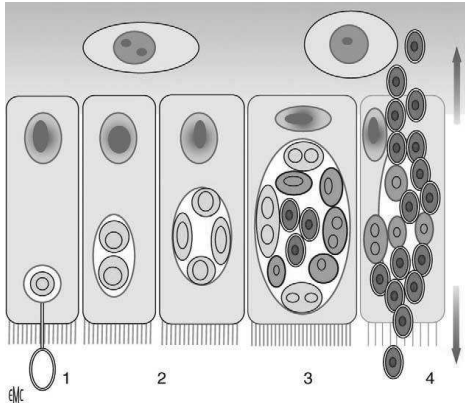


Figure 4 - Développement d'*Encephalitozoon intestinalis* dans l'épithélium intestinal [1]

Les variantes pour *Enterocytozoon bieneusi* :

Une fois le sporoplasme injecté dans la cellule, le méronte - contenant 4 noyaux – augmente très rapidement de volume, il évolue alors en plusieurs sporontes avec de nombreux noyaux, qui se transforment eux même en sporoblastes unicellulaires. Lors de ce stade, la maturation en spores est réalisée lorsque l'exospore est sécrétée ainsi que l'endospore. [1, 2] Leur dissémination se fait par desquamation de l'entérocyte, dans la lumière intestinale. Une partie des spores transmet l'infection aux cellules voisines et l'autre partie est éliminée dans les selles. [1] Pour cette espèce, le caractère parasite est bien visible lors de l'association de la membrane du méronte avec le réticulum endoplasmique et la mitochondrie de la cellule hôte en effet, cela reflète la dépendance de la microsporidie à sa cellule hôte pour sa nutrition et son métabolisme. [2]

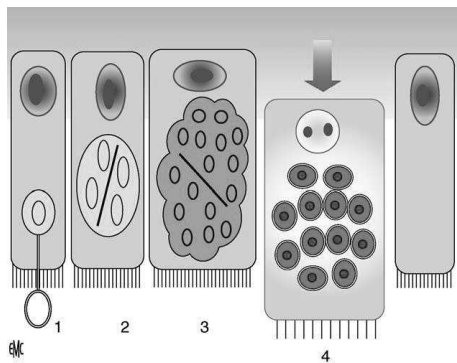


Figure 5 - Développement d'*Enterocytozoon bienewisi* dans l'épithélium intestinal [1]

1-4- Modes de transmission

La forme infestante est la spore qui se retrouve rappelons-le, dans la lumière intestinale de l'hôte infecté, donc dans ses selles. Le mode de contamination est oro-fécale, le plus probablement indirectement via l'eau, soit de boisson soit par les aliments contaminés par l'eau d'irrigation, soit l'eau des piscines ou autres espaces de loisir aquatique ("hydropinie"). [1, 6]

Les spores sont également retrouvées chez les animaux de compagnie et d'élevage : chien, chat, porc, chèvre, âne, bovins, lapins. [1]

Les Hommes et animaux immunocompétents porteurs asymptomatiques représentent des réservoirs et sources potentielles de contamination pour le sujet immunodéprimé, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments contaminés. [1]

Pour *Encephalitozoon intestinalis*, une seule souche (identifiée par analyse de séquences génomiques) contamine à la fois l'Homme et l'animal contrairement à *Enterocytozoon bienewisi* chez qui on reconnaît plusieurs souches. Ainsi, cette dernière espèce est retrouvée chez les mammifères sauvages tels que renard, loutre, ragondin, raton laveur et les oiseaux comme le poulet d'élevage, le pigeon en zone urbaine. [1]

Les facteurs qui favorisent la transmission par l'eau sont l'élimination de spores dans les urines et les fèces des animaux, ce qui contamine les sources d'eau potable, la forte résistance des spores dans le milieu extérieur et la faible quantité de spores pouvant provoquer une infection. [6] La durée estimée de survie de la spore dans l'environnement est de 2 ans à 4 °C. La spore est détruite à une température supérieure ou égale à 60 °C et après 24 heures à -20 °C. [11]

Encephalitozoon cuniculi se transmet par inhalation, contact direct et aérosol, et a pour hôte des rongeurs, des animaux domestiques (lapins, chiens) qui peuvent constituer des réservoirs. [1, 5, 6] Trois génotypes ont été décrits dont deux d'entre eux sont communs à l'Homme et à l'animal. [10]

1-5- Signes cliniques de la microsporidiose humaine

En effet, le principal signe clinique est la diarrhée avec des selles aqueuses, non sanglantes à raison de 3 à 10 selles par jour, sans fièvre. [5] Cette diarrhée s'accompagne de nausées, de douleurs abdominales, associées à une perte de l'appétit qui conduit à une perte de poids progressive. [1]

Chez l'immunocompétent, ces diarrhées sont spontanément résolutes. [1]

Chez l'immunodéprimé, notamment les patients atteints de SIDA ayant des lymphocytes T CD4⁺ inférieurs à 100/mm³, les signes cliniques ressemblent beaucoup à ceux développés lors de l'infection à *Cryptosporidium* aboutissant à des formes graves avec déshydratation et cachexie. [1, 7]

En l'absence de réponse immunitaire adaptée, il peut y avoir une dissémination de l'infection surtout avec le genre *Encephalitozoon*, rencontrée principalement chez les patients infectés par le VIH et les transplantés qui présentent des manifestations plus sévères. Parmi ces manifestations on peut noter une forte fièvre, une atteinte gastro-intestinale sévère, une insuffisance rénale, une kératoconjonctivite, une sinusite et des atteintes neurologiques et respiratoires. [1, 6]

Les formes disséminées dépendent du tropisme de l'espèce. [6]

Enterocytozoon bieneusi qui est l'espèce la plus fréquemment rencontrée, responsable de 90% des cas de microsporidiose intestinale, peut être responsable d'infections des voies biliaires (des cas de cholangite sclérosante et de cholécystite alithiasique ont été décrits), des bronches, des sinus. [1, 5, 9]

Encephalitozoon intestinalis quand à elle, peut provoquer des rhino-sinusites, bronchites, kératoconjonctivites, des atteintes neurologiques centrales, avec une prédominance pour les infections de l'arbre urinaire et des réactions inflammatoires au niveau des organes mais surtout des infections disséminées avec atteinte de multiples organes, probablement par voie hématogène médiée par les macrophages. [3, 5] La fièvre est constante. [10]

Encephalitozoon cuniculi peut être à l'origine d'encéphalites, hépatites, cholécystites, néphrites, entérites, rhinites, sinusites, kératoconjonctivites et infections disséminées. [6] Cette espèce est très polymorphe tant par l'intensité de la symptomatologie que par la diversité des organes atteints. [10]

Il existe aussi une forme oculaire de la microsporidiose qui est la deuxième localisation la plus commune après la microsporidiose intestinale. Cette pathologie oculaire se traduit par des kératoconjonctivites et des kératites profondes. [6]

1-6- Physiopathologie

Les microsporidies intestinales colonisent l'intestin grêle ce qui provoque un effondrement des villosités, une accumulation des graisses et une desquamation épithéliale importante. L'atrophie villositaire fait place à une hyperplasie des cryptes et a pour conséquence la réduction de la surface d'absorption (jusqu'à 40% en moins). Cela entraîne une chute de l'activité enzymatique, la malabsorption des graisses, des déficits en potassium, magnésium, vitamine B12, D-xylose et une acidose métabolique. [1, 6]

Enterocytozoon bienewisi colonise la partie apicale de la villosité alors qu'*Encephalitozoon intestinalis* infecte toute la hauteur de la villosité intestinale, les cryptes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales du chorion, les neutrophiles, ce qui provoque l'ulcération sévère de l'intestin grêle avec atrophie de la muqueuse, une inflammation aiguë puis chronique avec une infiltration de la muqueuse par des cellules inflammatoires. Ces mécanismes sont responsables de la dissémination de l'infection par *Encephalitozoon intestinalis* avec une réaction inflammatoire au niveau hépatique, pancréatique, pulmonaire, rénal. [6]

Les signes cliniques graves et/ou chroniques n'apparaissent que lorsque les Lymphocytes T CD4 sont inférieurs à 200 voire 100 par mm³. [16]

1-7- Réponse immunitaire vis-à-vis des microsporidies

1-7-1- Rôle de l'immunité humorale

Les anticorps jouent un rôle pour limiter l'infection chez l'hôte, mais cela n'est pas suffisant pour prévenir la mortalité ou la guérison de l'infection. [12]

Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'exospore ou le filament polaire sont capables d'inhiber l'infection de cellules non phagocytaires par les microsporidies du genre *Encephalitozoon*. [14] En revanche, certaines études rapportent que les anticorps ne sont protecteurs que quand de l'interféron- γ est administré simultanément. D'autre part, une protéine microsporidienne EcMsAP potentiellement impliquée dans l'adhérence de la spore à la cellule hôte a été récemment décrite. Le blocage des épitopes sur cette protéine par les anticorps spécifiques pourrait faire partie de la stratégie de l'hôte pour contrôler l'infection microsporidienne. Les anticorps neutralisent l'invasion et la croissance mais requièrent l'action des macrophages directement activés par l'interféron- γ (ou indirectement par d'autres mécanismes dépendants de l'interféron- γ) pour une destruction du micro-organisme. [13] Les anticorps et l'interféron- γ sont complémentaires contre l'infection microsporidienne. Les anticorps liés aux antigènes de la spore microsporidienne peuvent induire la destruction des microsporidies en favorisant la phagocytose (opsonisation) des spores par les macrophages ou bien en induisant l'activation du complément susceptible d'entraîner la lyse des stades parasitaires. Les anticorps ne permettent donc pas à eux seuls

le contrôle et l'éradication des infections microsporidiennes mais ils jouent un rôle dans la limitation de la dissémination de l'infection.

Néanmoins, des mécanismes d'échappement sont élaborés par les microsporidies, par exemple *Encephalitozoon cuniculi* peut infecter les macrophages et se multiplier à l'intérieur de ces cellules phagocytaires, grâce à l'absence de fusion entre la vacuole parasitophore et les lysosomes.

1-7-2- Rôle de l'immunité cellulaire

Elle est importante pour la survie de l'hôte infecté par *Encephalitozoon cuniculi*. [12]

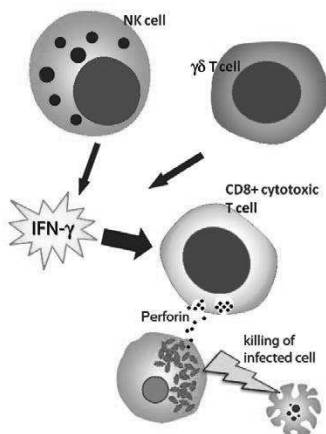


Figure 6 - Rôles des cellules T CD8+ cytotoxiques dans la réponse immunitaire contre la microsporidiose [15]

1-7-2-1- Rôle des macrophages

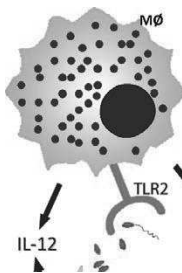


Figure 7 - Reconnaissance innée d'*Encephalitozoon* sp. par TLR2 sur les macrophages [15]

A la surface des macrophages humains, *Encephalitozoon* sp. est un ligand du Toll-like Receptor 2 (TLR2) dont la liaison induit des réponses immunitaires mais lui permet également d'y échapper. La reconnaissance innée d'*Encephalitozoon* sp. par TLR2 sur les macrophages induit une réponse inflammatoire suffisante pour détruire les microsporidies et donc, qui pourrait rendre les cellules T CD4+ non nécessaires à une réponse efficace.

La mort effective des spores de microsporidies phagocytées par les macrophages est due à la production de métabolites toxiques de l'oxygène comme le monoxyde d'azote (NO). [13, 14]

Cependant, les macrophages peuvent être impliqués dans la dissémination de l'infection car les spores survivent dans les phagosomes et échappent aux macrophages par germination et occasionnellement par pénétration dans les cellules ou tissus adjacents. De plus, les macrophages infectés produisent des chimiokines qui attirent les monocytes non différenciés, ce qui permet le développement de l'infection. [15]

La phagocytose des spores est le mode de dissémination de l'infection le plus souvent observé en effet, elle a été signalée dix fois plus souvent que l'injection du sporoplasme par le tube polaire. [13]

1-7-2-2- Rôle des lymphocytes T CD4+ et CD8+

Les lymphocytes T CD8+ ont un rôle crucial, en effet, des études montrent que les souris déficientes pour le gène codant pour la molécule CD8 succombent à *Encephalitozoon cuniculi* avec dissémination de l'infection dans le foie et la rate. En revanche, les souris déficientes pour le gène codant pour CD4 ne meurent pas lors de l'infection par *Encephalitozoon cuniculi*, même en cas de forte charge parasitaire. Contrairement aux cellules T CD8+, les cellules T CD4+ ne sont donc pas nécessaires pour la protection contre l'infection. La réponse des cellules T CD8+ à l'infection par *Encephalitozoon cuniculi* peut-être développée indépendamment des cellules T CD4+. [12] L'absence de cellules T CD4+ ne modifie ni l'ampleur de la réponse cytotoxique spécifique ni le type de cytokines sécrétées par les cellules T CD8+ durant l'infection par *Encephalitozoon cuniculi*.

Parmi les infections parasitaires intracellulaires, l'infection par *Encephalitozoon cuniculi* offre un exemple, de la façon dont la réponse des cellules T CD8+ peut être induite en l'absence de cellules T CD4+. [12] Bien que classiquement, la réponse des cellules T CD8+ requière la coopération des cellules T CD4+, il a été montré que la réponse médiée par les cellules T CD8+ lors de la réponse primaire contre les différents agents infectieux peut se développer en l'absence de cellules T CD4+. Les souris déficientes pour le gène codant pour CD4, infectées, ne souffrent pas de l'augmentation de la charge parasitaire, et il n'existe pas d'anomalie de réponse des cellules T CD8+ car il n'y a pas de différence significative dans l'amplitude de la réponse cellulaire spécifique T CD8+ vis-à-vis du parasite. Même si ces cellules T CD4+ auxiliaires ne sont pas strictement nécessaires à l'activation des cellules T CD8+, il est curieux que leur absence n'ait pas d'effet sur l'amplitude de cette réponse, car ils sont la principale source de la cytokine IL-2 qui favorise la prolifération des cellules T. Il est important de noter que toutes les études conduites chez l'animal à ce jour n'ont exploré que la réponse primaire. Beaucoup de récentes études immunologiques indiquent que les réponses primaires des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques peuvent s'opérer indépendamment des cellules T CD4+, mais l'aide des cellules T CD4+ est nécessaire pour générer et entretenir une sous-population de cellules T CD8+ mémoires fonctionnelle. Ainsi, s'il y a en effet un déficit et/ou un dysfonctionnement des cellules T CD4+ spécifiques lors de la première rencontre avec les microsporidies, il est possible que cela n'ait de répercussions réelles que lors d'une infection secondaire. [15]

1-7-2-3- Rôle de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+

Les cellules T CD8+ peuvent réduire la charge parasitaire en tuant les cellules cibles infectées dans le tissu de l'hôte. Le mécanisme de destruction majoritairement utilisé par les cellules T CD8+ est la voie dépendante de la perforine qui permet la perforation de la paroi épaisse de la spore microsporidienne. En effet, les souris déficientes pour le gène de la perforine, comme celles n'exprimant pas celui codant le CD8, succombent à l'infection par *Encephalitozoon cuniculi*. Cela montre l'importance de la réponse des cellules T cytotoxiques chez l'animal infecté. L'infection par *Encephalitozoon cuniculi* induit une forte réponse des cellules T CD8+, qui limite la croissance du parasite par la lyse dépendante de la perforine des macrophages infectés. Les cellules T CD8+ sont des cellules effectives primaires responsables du contrôle de la réplication du parasite. [12] L'effet protecteur des cellules T CD8+ est du également à leur capacité à produire des cytokines.

Il a été montré que les cellules T CD8+ étaient indispensables pour la protection immunitaire contre la microsporidiose, effectivement, les souris déficientes pour le gène codant le CD8 ne peuvent survivre à l'infection. Les cytokines sécrétées par les cellules T CD8+ peuvent jouer un rôle mais il est probable que leur cytotoxicité directe soit cruciale, comme en témoigne la mort de la souris suite à l'infection en l'absence de gène codant pour la perforine. Ce rôle indispensable des cellules T CD8+ est logique car les microsporidies sont des pathogènes intracellulaires, et la seule étape extracellulaire est la spore qui peut être difficile à éliminer du fait d'une part de son épaisse paroi et d'autre part en cas de phagocytose de sa résistance aux enzymes lysosomales. [15]

1-7-2-4- Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ +

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse par les cellules T CD8+ durant l'infection. [15] En effet, l'induction de l'immunité des cellules T CD8+ par les cellules T $\gamma\delta$ peut-être due à leur capacité de libérer de façon anticipée l'interféron- γ nécessaire à l'activation des cellules T CD8+ telle que rapportée dans d'autres modèles. Les cellules T $\gamma\delta$ dont le nombre augmente au début de l'infection, représentent probablement une source importante d'interféron- γ . En effet, la présence de cellules T $\gamma\delta$ apparaît cruciale pour l'induction d'une réponse immunitaire optimale médiée par les cellules T CD8+. L'activation des cellules T CD8+ est au moins partiellement régulée par les cellules T $\gamma\delta$. Cette régulation peut-être dépendante de la capacité des cellules T $\gamma\delta$ à produire des cytokines comme l'interféron- γ . [12]

Le rôle de l'interféron- γ dans l'induction et le maintien de la réponse immunitaire des cellules T CD8+ a été clairement démontré. [12]

La production de l'interleukine-12 et l'interféron- γ par les cellules dendritiques jouent également un rôle dans l'amorçage des cellules T CD8+ dans ce type d'infection. [15]

1-7-2-5- Rôle des cytokines

Il existe une famille de cytokines nommés les chimiokines, qui possèdent toutes en commun un pouvoir attracteur sur les leucocytes (notamment les neutrophiles, monocytes, lymphocytes) et présentent 20 à 95% d'homologie de séquence. Elles ont pour fonctions de recruter des cellules immunitaires effectrices (macrophages, granulocytes et lymphocytes T) au site de l'infection et d'induire et/ou d'influencer la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 ou Th2. L'effet des chimiokines sur la polarisation de la réponse immune vers un profil Th1 ou Th2 est d'une importance capitale pour le contrôle des infections par des parasites intracellulaires. Ces dernières sont associées à la réponse immunitaire de type Th1. Effectivement, les lymphocytes Th1 sécrètent surtout de l'interféron- γ et du TNF- α , ces cytokines sont impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire qui permet l'élimination des pathogènes intracellulaires. Contrairement aux lymphocytes Th2 qui produisent essentiellement de l'interleukine-4, 5 et 10, cytokines qui sont associées au développement d'une immunité à médiation humorale caractérisée par la production d'anticorps. Les chimiokines sont capables d'influencer la nature de la réponse immunitaire mise en place suite à une infection en permettant le recrutement sélectif et préférentiel, soit des lymphocytes Th1 soit Th2. Cette propriété résulte de la différence d'expression des récepteurs pour les chimiokines à la surface de ces deux sous-populations lymphocytaires. [14]

Semblable à d'autres microorganismes intracellulaires, *Encephalitozoon cuniculi* peut entraîner une forte augmentation de la production d'interleukine-12 par les macrophages ou les cellules dendritiques de l'hôte. La libération d'interleukine-12 entraîne le début de la polarisation de la réponse immune vers le profil de cytokines Th1, ce qui a pour conséquence des niveaux élevés d'interféron- γ dans la circulation et les tissus. L'augmentation de la production d'interféron- γ provoque une régulation positive des molécules de classe I dans les cellules infectées, ce qui conduit à la prolifération des cellules T CD8+ spécifiques d'antigène. [12]

Les cytokines de type Th1 comme l'interféron- γ ont un rôle majeur dans la résistance aux microsporidies. [14] L'interféron- γ est un puissant activateur des macrophages, ce qui cause la mort effective des spores de microsporidies phagocytées, par la production de métabolites toxiques de l'oxygène. Il aurait également la capacité à augmenter l'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (NK). Il joue un rôle essentiel dans l'acquisition de l'immunité protectrice contre les pathogènes intracellulaires opportunistes. [13]

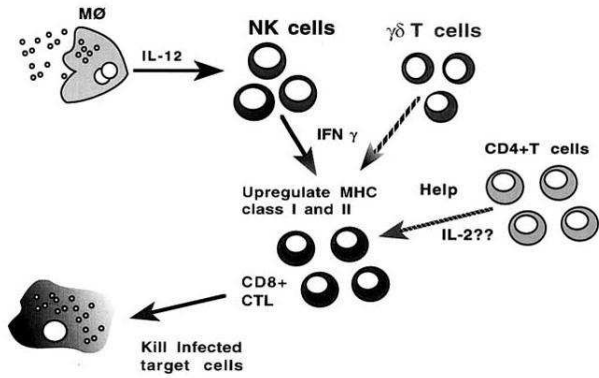


Figure 8 - La réponse immunitaire à *Encephalitozoon cuniculi* [12]

1-8- Facteurs de risque

- La microsporidiose n'a pas de caractère saisonnier. [9]

Facteurs de risque non modifiables :

- L'âge favorisent l'infection : les enfants et notamment les enfants malnutris...
- Les hommes seraient plus touchés que les femmes.
- Les patients à risque de développer une microsporidiose sévère sont ceux dont la réponse immunitaire à médiation cellulaire est déficiente, essentiellement les patients infectés par le VIH et les patients transplantés d'organe solide recevant un traitement immunosuppresseur anti-rejet de greffe.
- L'homosexualité

Facteurs de risque modifiables :

- La malnutrition
- L'incidence de l'infection est augmentée chez les voyageurs en zone tropicale
- Les porteurs de lentilles de contact [1, 6]
- La fréquentation des piscines seraient associées à un risque accru de microsporidiose intestinale [17]

1-9- Diagnostic

Les microsporidies ont été découvertes par microscopie électronique sur des coupes ultrafines de biopsies de l'intestin grêle. [1] Les diagnostics différentiels cliniques sont pour les parasites les infections par *Cryptosporidium sp.*, *Isospora belli*, *Sarcocystis hominis*. [7]

Actuellement, l'isolement et la culture ne constituent pas un outil diagnostique. [3]

Pour réaliser le diagnostic, on effectue un prélèvement de selles qui doit être renouvelé 2 fois sur trois jours au total, car les microsporidies sont éliminées dans les selles par intermittence. [6]

1-9-1- Techniques de coloration : recherche de spores

On recherche les spores de microsporidies dans les liquides biologiques comme les selles, les urines, le liquide d'écoulement nasal, le liquide de lavage bronchoalvéolaire, les biopsies tissulaires.

1-9-1-1- Techniques utilisant des colorants non fluorescents

Les colorants utilisés sont le Giemsa (peu spécifique), le Quick Hot Gram Chromotrope (qui a une bonne spécificité vis-à-vis des microsporidies par coloration violette de la spore), le trichrome modifié, selon Weber, qui est le colorant le plus spécifique et le plus utilisé pour identifier les spores, au microscope optique, elles apparaissent ovoïdes et se colorent en rose. [5, 6]

La préparation de l'échantillon pour la méthode du trichrome de Weber modifié :

On prélève un échantillon, de la taille d'une noix de beurre, qui est mis en suspension dans 4 ml de Formol à 10 % puis, qui est filtré successivement à travers deux tamis, de 450 μm et 50 μm , et centrifugé à 3000 tours par minute (rpm) pendant 10 min. Deux étalements sur lame de 10 μl du culot sont réalisés, séchés, fixés puis colorés au trichrome de Weber modifié. [5]

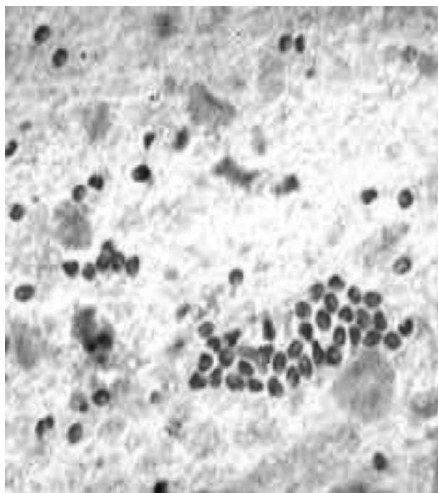


Figure 9 - Spores de microsporidies dans un prélèvement de selles traitées par le trichrome de Weber modifié [6]

On conseillera d'associer la méthode du trichrome modifié de Weber qui a une bonne spécificité, à un fluorochrome qui a une excellente sensibilité afin d'avoir une meilleure identification. [5]

La technique de Weber est longue et fastidieuse.

Une autre coloration peut être également utilisée chez un patient immunodéprimé présentant une diarrhée, le Trichrome Acid Fast qui a l'avantage de colorer simultanément les microsporidies et les cryptosporidies (aussi responsables de diarrhées chroniques chez l'immunodéficient). Cette technique est facile, peu coûteuse et rapide. [5]

1-9-1-2- Techniques utilisant des fluorochromes

Le prélèvement est fixé au méthanol et marqué par un fluorochrome tel que le Calcofluor®, l'Uvitex 2B ou l'Uvibio® qui sont tous des marqueurs fluorescents de la chitine, composant de la paroi des spores de microsporidies et du genre *Candida*, ce qui offre une spécificité décevante. [1, 5] On observe l'échantillon grâce à un microscope photonique à fluorescence (longueurs d'onde de 350 nm à 440 nm). Les spores apparaissent ainsi blanches ou turquoise. [6]

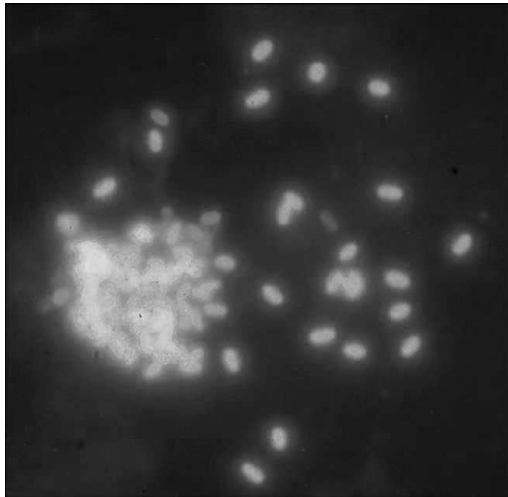


Figure 10 - Spores de microsporidies à l'Uvitex 2B grossissement 100 [6]

1-9-2- Identification de l'espèce

Pour déterminer l'espèce, 3 méthodes sont utilisables : la PCR, l'immunofluorescence directe utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques, la microscopie électronique. [1]

1-9-2-1- Amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette méthode est très sensible. [1] Elle consiste à utiliser une paire d'amorces complémentaires d'une séquence conservée d'ADN codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal, qui permet l'amplification des quatre genres majeurs de microsporidies. Il existe 3 types de PCR : PCR conventionnelle, PCR quantitative, PCR multiplexe.

1-9-2-1-1- PCR conventionnelle

On amplifie les gènes codant pour la petite sous-unité ribosomal mais aussi la grande sous-unité ou l'espace de transcription interne. Cette technique est sensible, spécifique et reproductible. C'est une alternative intéressante au microscope électronique. Elle a un rôle important dans la décision thérapeutique. Le seuil de détection est de 100 spores par gramme de matières fécales (pour comparaison, le microscope optique a un seuil de 10 000 à 1 000 000 spores par gramme). Il y a tout de même quelques inconvénients pour cette méthode : elle est longue, couteuse, il faut un laboratoire spécialisé et un risque de contamination de l'échantillon n'est pas à négliger, donc un risque de faux-positifs. [6]

Cette technique oriente l'identification des espèces grâce à la taille des amplicons, ce qui constitue son avantage majeur. [18]

Enterocytozoon bieneusi étant l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les cas de microsporidiose intestinale, des techniques de PCR conventionnelle spécifiques d'*Enterocytozoon bieneusi* ont été développées à partir de travaux initialement publiés en 1993 par Zhu *et al.* et qui sont depuis utilisées par différentes équipes. L'extraction s'effectue toujours par le kit QI Amp DNA® mais, lors de l'amplification, on utilise un couple d'amorces spécifiques d'*Enterocytozoon bieneusi* : Eb.gc et Eb.gt qui s'hybrident sur la région ITS de la petite sous-unité ribosomale de celle-ci. Ces amorces amplifient un fragment d'ADN de 210 pb révélé sur le gel d'agarose par les mêmes techniques vues précédemment. [19]

On peut effectuer une restriction enzymatique par la suite, grâce à une endonucléase qui permet de différencier *Enterocytozoon bieneusi* d'*Encephalitozoon intestinalis*. En effet, on obtient des fragments de tailles différentes en fonction de l'espèce. [3]

1-9-2-1-2- PCR quantitative

Comme son nom l'indique elle permet, en plus d'identifier l'espèce, de quantifier la charge parasitaire. Cette technique est spécifique et très sensible puisque le seuil de détection est de 40 spores par millilitre de suspension de selles. Elle a un double avantage : le suivi de

l'éradication des microsporidies au cours du traitement (la cinétique) et l'évaluation de l'efficacité du traitement, elle permet également de différencier le portage asymptomatique de l'infection lorsque les résultats sont positifs. De plus, le temps de réaction est réduit par rapport à la PCR conventionnelle ainsi que le risque de contamination de l'échantillon, donc de faux-positifs. [6]

1-9-2-1-3- PCR multiplexe

Avec cette méthode, à l'aide de deux couples de sondes spécifiques, on peut reconnaître simultanément *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon* sp. [6] Les amorces spécifiques sont V1/EB450 pour *Enterocytozoon bienewisi* et V1/IS500 pour *Encephalitozoon intestinalis*. [18]

1-9-2-2- Technique d'immunofluorescence directe utilisant des anticorps monoclonaux

Cette technique permet d'identifier spécifiquement les espèces de microsporidies intestinales. Elle fait appel à des anticorps monoclonaux spécifiques, couplés à un fluorochrome (isothiocyanate de fluorescéine, FITC), reconnaissant des antigènes de la paroi. [1] Les avantages de cette technique sont nombreux, elle est simple, rapide, sensible et très spécifique (100%). Elle est une alternative à la PCR pour le diagnostic des microsporidies intestinales. [6]

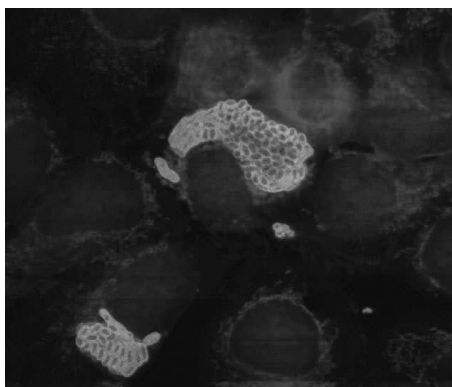


Figure 11 - Spores d'*Encephalitozoon intestinalis* groupées dans vacuoles parasitophores marquées par un anticorps monoclonal (Immunofluorescence directe) [1]

1-9-2-3- Microscopie électronique

Elle peut s'utiliser sur différents prélèvements comme des biopsies de tissus ou d'organes, des fluides biologiques : urines, lavage broncho-alvéolaire, aspiration duodénale, selles. Les caractéristiques structurales de la spore permettent d'identifier le genre et l'espèce. Les caractères discriminants sont principalement la structure et l'organisation du filament polaire, les modalités de division cytoplasmique et nucléaire, les différentes phases du cycle et la nature de l'interface hôte-microsporidie. [6]

Pour les prélèvements de liquides biologiques et de selles, la différenciation entre les espèces est difficile car beaucoup de stades sont absents ; il reste principalement le stade spore. En revanche, pour les biopsies d'organes ou de tissus, la microscopie électronique est une méthode spécifique car les différents stades de développement sont présents. [6]

Cependant, les résultats ne peuvent pas être obtenus rapidement et ils sont difficiles à interpréter, cette technique n'est donc pas utilisée en routine. [6]

Pour finir sur le diagnostic, un petit aparté sur la sérologie, peu praticable pour le diagnostic spécifique car il y a une réactivité croisée entre les espèces du genre *Encephalitozoon*, une altération de la réponse humorale chez l'immunodéprimé et la présence d'anticorps chez les sujets asymptomatiques. [1]

1-10- Traitements

Il existe plusieurs traitements dont l'efficacité dépend de l'espèce en cause. Les critères d'efficacité sont la régression des signes cliniques et la négativation des prélèvements. [6] Les molécules actives auraient seulement une activité microsporidistatique. [3]

1-10-1-Albendazole

Il fait partie de la famille des benzimidazolés (anti-helminthes), son nom commercial français est le Zentel® (ou Eskazole®, à l'hôpital), sa cible est la sous-unité β de la tubuline. [6] Il inhibe la division des microsporidies par blocage de la synthèse de la tubuline. Il est utilisé hors AMM pour la microsporidiose intestinale en effet, les indications de l'AMM sont l'oxyurose, l'ascaridiose, l'ankylostomose, la trichocéphalose, l'anguillulose, la téniaose, la giardiose de l'enfant et la trichinellose. [20] C'est le traitement de choix pour les microsporidioses intestinales, oculaires et disséminées à *Encephalitozoon* spp. mais il est inefficace sur *Enterocytozoon bieneusi* (parasitostatique par inhibition incomplète de la réplication). Il est métabolisé par le foie en un métabolite plus actif et moins toxique : le

sulfoxide. [6] Pour le genre *Encephalitozoon*, les dérivés sulfoxide et sulfone de l'albendazole seraient d'une plus grande efficacité mais ils ne sont pas disponibles en pratique. [3] La posologie est de 400 mg deux fois par jour pour un adulte et de 7,5 mg par kilogramme deux fois par jour pour un enfant, par voie orale lors d'un repas riche en graisses (mieux absorbé) sans purge ou jeûne préalable pendant deux à quatre semaines. [20] La forme comprimé ne doit pas être administrée en cas de galactosémie congénitale, syndrome de malabsorption du glucose et du galactose et/ou un déficit en lactase. [20] Les effets indésirables sont les troubles digestifs de type diarrhée, douleurs abdominales, une faible augmentation des transaminases, protéinurie, manifestations neurologiques, exceptionnellement alopecie, céphalées, malaise avec vertiges, rash cutanée, fièvre, prurit et très exceptionnels : neutropénie, pancytopenie, pour la forme comprimé, des réactions allergiques peuvent survenir à cause de la présence de jaune orangé S. [20] Ce médicament nécessite la surveillance de la numération formule sanguine et des fonctions hépatiques en début de traitement à cause de la possibilité de survenue de la leucopénie, de la pancytopenie ou de l'augmentation des transaminases. Il est contre-indiqué en cas d'hypersensibilité à l'albendazole et déconseillé en cas de grossesse ou d'allaitement. [20] L'association à la cimétidine, à la dexaméthasone et au praziquantel augmente le taux plasmatique de l'albendazole. [6]

1-10-2-Fumagilline

Cet antibiotique, extrait d'*Aspergillus fumigatus*, a des effets inhibiteurs *in vitro* sur un certain nombre d'espèces de microsporidies. [20] Il existe sous plusieurs noms commerciaux : Fumidil®, Fumadil®, Fugillin®, Fumagillin® et Flisint®, ce dernier étant disponible en France. [6] Sa cible d'action est une métalloprotéase cellulaire, la méthionine aminopeptidase-2 (MetAP2). Il inhibe la réplication de la microsporidie par blocage réversible du site d'action de la méthionine aminopeptidase-2 ainsi que la synthèse d'ARN. [6] Il est connu pour être utilisé par les apiculteurs contre la nosématose chez l'abeille. [1] Il est utilisé pour traiter les diarrhées sévères dues à *Enterocytozoon bieneusi* chez les patients adultes, infectés par le VIH, sévèrement immunodéprimés après échec d'une restauration immunitaire par traitement antirétroviral. La fumagilline a montré son efficacité dans le traitement des infections à *E. bieneusi* chez les patients atteints de SIDA, mais elle n'a pas encore été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis. La posologie est de trois gélules de vingt milligrammes trois fois par jour pendant quatorze jours en dehors des repas. [1, 20] L'efficacité a été établie par les résultats d'une étude en double aveugle versus placebo (EFC4918/ANRS090) incluant douze patients de sexe masculin immunodéprimés, dont dix infectés par le VIH et deux transplantés d'organe solide. Les effets indésirables très fréquents sont la thrombocytopénie, granulocytopenie, douleurs abdominales, augmentation des taux sanguins des transaminases et des lipases, fièvre, insomnie, toux, prurit. Une anémie, de la diarrhée, des nausées, des vomissements, de l'asthénie, une dyspnée (pneumonie) et un rash cutanés sont des effets indésirables

fréquemment décrits. [20] Ces effets nécessitent une surveillance particulière durant le traitement avec une numération formule sanguine régulière. [1] La fumagilline a également été utilisée *in vitro* sur le genre *Encephalitozoon* et *Vittaforma corneae*. Elle est contre-indiquée en cas d'hypersensibilité à la fumagilline, de plaquettes inférieures à 150000/mm³ avant l'initiation du traitement, d'anomalie biologique sévère (hémoglobine inférieure à 8 g/dL, polynucléaires neutrophiles inférieurs à 1000/mm³, créatininémie supérieure 175 µmol/L, transaminases supérieures à trois fois la normale, bilirubine supérieure à deux fois la normale, lipasémie supérieure à deux fois la normale), allaitement. [6] Elle est déconseillée pendant la grossesse et chez la femme en âge de procréer n'utilisant pas de mesures de contraception. Il n'y a pas d'interaction médicamenteuse connue. En cas de surdosage, il n'y a pas d'antidote. Ce médicament est réservé à l'usage hospitalier et nécessite une surveillance particulière pendant le traitement. En effet, un bilan hématologique est effectué préalablement avant le traitement, puis de façon bihebdomadaire durant le traitement et jusqu'à quatre semaines après l'interruption du traitement car la fumagilline a une toxicité sur la moelle osseuse dose-dépendante. Le traitement doit être interrompu si les plaquettes chutent sous 75000/mm³. Il doit être conservé à l'abri de la lumière, au congélateur à -20 °C avant l'ouverture et, après ouverture, au réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C durant quatorze jours maximum. [20]

Ces deux premières molécules sont les plus efficaces pour traiter respectivement, *Encephalitozoon intestinalis* et *Enterocytozoon bieneusi*. [6]

1-10-3-Nitazoxanide

Le nitazoxanide a pour nom de spécialité Alinia®. Il bénéficie d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative en France. Deux formes pharmaceutiques existent : la suspension buvable contenant 100 mg de principe actif par 5 ml et le comprimé dosé à 500 mg. L'Alinia® agit en inhibant l'enzyme pyruvate ferredoxine oxydoréductase (PFOR) de *Giardia* mais le mécanisme d'action est inconnu pour la cryptosporidiose et la microsporidiose. Les indications sont les diarrhées causées par *Giardia lamblia* ou *Cryptosporidium* sp. chez le patient immunocompétent âgé de plus de 12 mois. [21] Effectivement, il est le seul médicament approuvé (FDA) pour le traitement de la cryptosporidiose de l'immunocompétent. [22] Le nitazoxanide a également une activité sur les protozoaires comme *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* (notamment *Giardia* résistant au métronidazole), *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis hominis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Balantidium coli*, *Isospora belli*, *Trichomonas vaginalis* (notamment *Trichomonas* résistant au métronidazole), *Besnoitia besnoiti* ; les helminthes : *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Hymenolepis nana*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis* ; les bactéries notamment *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp. et des bactéries microaérophiliques telles que *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*. [22] Il a été utilisé pour traiter un cas

d'Enterocytozoon bieneusi, à la posologie d'un gramme deux fois par jour pendant soixante jours et serait efficace *in vitro* sur *Encephalitozoon intestinalis*. [1, 6] L'hypersensibilité au nitazoxanide ou à un excipient de la formulation contre-indique l'utilisation de l'Alinia®. La posologie est fonction de l'âge en effet, de 1 à 3 ans on administre 5 ml de suspension buvable à savoir 100 mg de principe actif toutes les 12 heures ; de 4 à 11 ans 10 ml c'est-à-dire 200 mg toutes les 12 heures et à partir de 12 ans 500 mg soit un comprimé ou 25 ml de suspension buvable toutes les 12 heures. La prise du médicament doit s'effectuer pendant un repas car son absorption est meilleure. [22] Le nitazoxanide, un 5-nitrothiazolyl salicylamide, est le premier thiazolide synthétisé. Il est rapidement désacétylé en tizoxanide son principal métabolite actif, qui se lie aux protéines plasmatiques à plus de 99,9 % et est éliminé dans les urines et dans la bile après glycuco-conjugaison dans le foie (sous sa forme appelée glycuronate de tizoxanide) et les selles. L'administration doit être effectuée avec précaution en cas de pathologie biliaire, hépatique ou rénale et chez le diabétique (pour la suspension buvable qui contient 1,48 g de sucre par 5 ml). Les effets indésirables liés à la forme comprimé sont les douleurs abdominales (6,6 %), la diarrhée (4,2 %), la migraine (3,1 %), les nausées (3 %). D'autres effets indésirables peuvent survenir chez moins de 1 % des patients (asthénie, fièvre, des réactions allergiques, douleurs pelviennes, syndrome grippal, frissons, somnolence, insomnie, hyperesthésie, vertiges, vomissements, dyspepsie, anorexie, flatulences, constipation, décoloration des urines, dysurie, aménorrhée, métrorragies, douleurs rénales, anémie, leucocytose, épistaxis...). Les effets secondaires les plus fréquents liés à la forme suspension buvable sont les douleurs abdominales (7,8 %), de la diarrhée (2,1 %), des vomissements (1,1 %), des migraines (1,1 %) et les effets indésirables survenant chez moins de 1 % des malades sont : nausées, anorexie, flatulence, augmentation de l'appétit, fièvre, infection, malaise, augmentation de la créatinine, prurit, sueur, coloration jaune des conjonctives, rhinite, décoloration des urines, vertiges. [21]

C'est un antiparasitaire à large spectre qui a également une activité anti-virale (VHB, VHC, rotavirus). [22]

1-10-4-Autres molécules

Dérivés benzimidazolés :

Des dérivés sont actifs contre *Encephalitozoon intestinalis in vitro* mais le mébendazole est faiblement absorbé par voie orale et le nocodazole et le parabendazole ont des effets toxiques qui limitent leur utilisation. Le thiabendazole est bien absorbé mais faiblement actif. Par contre, le fenbendazole est rapidement absorbé par voie orale et métabolisé en oxfenbadazole très actif contre *Encephalitozoon intestinalis* et non toxique *in vitro*. [6]

TNP-470 :

C'est un analogue semi-synthétique de la fumagilline, l'O-(chloracetyl-carbamoyl) fumagillol. Il est appelé également AGM-1470, Fumagil®. C'est un inhibiteur angiogénique ayant le

même mécanisme d'action que la fumagilline, à savoir l'inhibition de la méthionine aminopeptidase-2. Le TNP-470 est efficace comme la fumagilline sur *Encephalitozoon intestinalis* et *Vittaforma corneae* en culture cellulaire, et moins toxique que la fumagilline. Il semble être prometteur dans le traitement de la microsporidiose. Aucun test n'a été publié avec ce dérivé sur la microsporidiose humaine pour le moment. [6]

Ovacilline :

C'est un antibiotique synthétisé par *Pseudorotium ovalis*, qui inhibe la méthionine aminopeptidase-2 et peut inhiber la réplication d'*Encephalitozoon intestinalis* et *Vittaforma corneae* *in vitro* et prolonger la survie de la souris infectée par *Vittaforma corneae*. [6, 23]

Fluoro-quinolones :

Ces antibiotiques ont pour mécanisme d'action contre la microsporidiose l'inhibition de la topoisomérase IV, une enzyme impliquée dans la division cellulaire. Didier et al. a testé l'activité de 15 fluoroquinolones *in vitro* contre *Encephalitozoon intestinalis* et *Vittaforma corneae* et chez les souris athymiques contre *Vittaforma corneae*. Les résultats *in vitro* montrent que seulement six composés peuvent inhiber la réplication des microsporidies. Chez les souris athymiques, aucune fluoroquinolone testée n'a montré d'efficacité pour détruire *Vittaforma corneae*. Cependant, quatre composés prolongent la survie des souris et sont susceptible d'être efficace en combinaison avec d'autres médicaments comme la fumagilline, qui, dans ce cas, peut-être administrée à doses non toxiques. [6]

Anti-mitotiques :

Deux composés: La pancratistatine et la 7-déoxynarciclasine inhibent la division cellulaire et ont été testées *in vitro* contre *Encephalitozoon intestinalis* pour déterminer leurs effets thérapeutiques dans la microsporidiose. Les résultats sont prometteurs. Mais, la cible de ces composés reste à être identifier. Ils agissent par inhibition du développement de la division cellulaire des microsporidies. [6]

Analogues des polyamines :

Ils sont composés d'ammoniums quaternaires, efficaces *in vivo* et *in vitro* sur *Enterocytozoon cuniculi* mais, bien que prometteurs, n'ont pas été testés sur l'Homme pour *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis*. [6]

Interféron γ :

L'interféron- γ est une cytokine produite par les lymphocytes T (LT) CD4+ dont l'effet protecteur est en partie médiée par la synthèse de cette cytokine. L'interféron- γ active les macrophages et potentialise les effets cytotoxiques des cellules NK. Une récente étude sur l'efficacité de l'interféron- γ chez les souris infectées par *Encephalitozoon cuniculi* montre que cette drogue peut-être utilisée pour le traitement de la microsporidiose, notamment, chez les patients avec des taux de LT CD4+ très faible. Cependant, il ne peut pas être utilisé chez les patients sous traitements immunosuppresseurs comme les greffés rénaux. [6]

Bien que l'on ait vu dans des modèles murins que les lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) n'étaient pas indispensables à la guérison, chez l'Homme, l'évolution favorable de la microsporidiose est dépendante du nombre de LT CD4+ fonctionnels par conséquent, le meilleur traitement est, en cas de déficit portant sur les LT CD4+, de restaurer l'immunité cellulaire du patient. [9]

1-11- Prophylaxie

Les sources et modes de transmission à l'Homme ne sont pas encore clairement établis ce qui compromet la mise en place de mesures de prophylaxie potentiellement efficaces.

Prophylaxie individuelle :

La contamination oro-fécale est la plus probable dans la majorité des cas. Donc, pour l'instant les mesures prophylactiques consisteraient en un lavage régulier des mains, à laver les fruits et les légumes, boire de l'eau en bouteille. Il faut bien cuire la viande et les poissons, limiter le contact avec les animaux susceptibles de transmettre la maladie. [6]

Pour l'instant, aucune chimio-prophylaxie n'est envisagée. Cependant, le maintien d'un taux de lymphocytes CD4+ correcte avec les trithérapies chez les patients VIH est indispensable. [6]

Prophylaxie de la population :

Le traitement de l'eau du robinet avec l'ozone ou les ions chlorures afin de réduire la viabilité et le pouvoir infectant du genre *Encephalitozoon*. D'autres méthodes de désinfection de l'eau (ammonium quaternaire, éthanol 70%, dérivés du phénol, peroxyde d'hydrogène, hydroxyde de sodium) ont été mises au point et sont létales *in vitro* pour *Encephalitozoon cuniculi* mais l'infectivité des microsporidies après traitement n'a pas été testée chez l'Homme. [6]

De plus amples recherches sont nécessaires pour clarifier l'épidémiologie de la microsporidiose et pour instituer des mesures préventives non seulement pour la population en générale mais aussi pour les sujets à risque. [6]

2- Analyse rétrospective des cas de microsporidiose intestinale diagnostiqués au laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Rouen de 1994 à 2013

2-1- Sélection des patients

L'analyse des selles se fait systématiquement pour les patients suivants :

- patients pris en charge par le service des Maladies Infectieuses et Tropicales (consultants ou hospitalisés, infectés ou non par le VIH)
- patients traités par des thérapeutiques immunosuppressives (services d'Oncologie, d'Hématologie adulte, d'Onco-Hématologie pédiatrique, de Néphrologie pour les patients transplantés rénaux)
- sur demande explicite d'autres services (rare)

De septembre 1994 à mai 2006, des microsporidies ont été trouvées dans 140 selles, sur 5600 selles examinées pour cette recherche soit 2,5 % des selles examinées, pour 26 patients différents.

On notera :

- 18/26 patients infectés par le VIH (stade SIDA)
- **1/26 immunodéprimé thérapeutique**
- 7/26 immunocompétents

De mai 2006 à mai 2013, 31 selles ont été trouvées positives pour 5144 recherches soit 0,6 % des selles examinées, pour 10 patients différents. Ils étaient tous infectés par *Enterocytozoon bienewisi*.

On notera :

- 1/10 patients infectés par le VIH (stade SIDA): (32 LT CD4+)
- **7/10 immunodéprimés thérapeutiques** (1 transplanté hépatique, 1 transplanté de moelle, 5 transplantés rénaux)
- 2/10 « voyageurs » (dont 1 enfant adopté de République Centrafricaine)

Donc, de septembre 1994 à mai 2013, il y a eu 5 cas de microsporidiose intestinale détectés au laboratoire de Parasitologie du CHU de Rouen chez des patients transplantés rénaux. Ces 5 cas seront développés dans la partie présentation des cas.

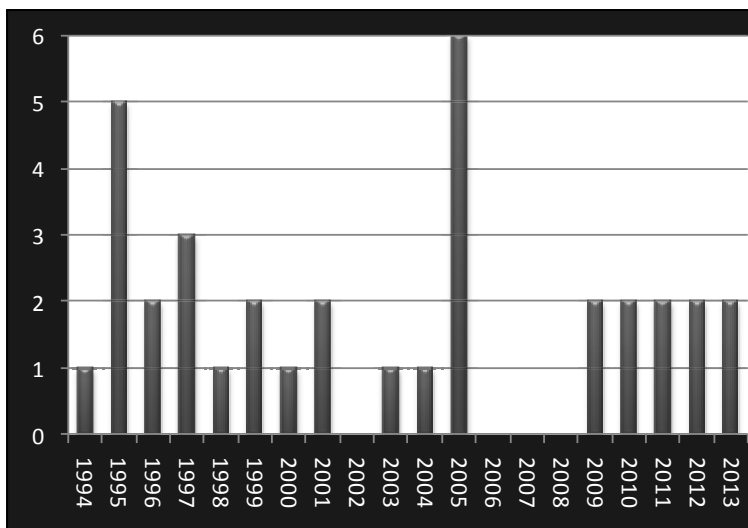


Figure 12 - Nombre de cas de microsporidioses diagnostiquées au laboratoire de Parasitologie du CHU de Rouen de novembre 1994 à mai 2013

Une inversion de la tendance a été très nettement observée entre les périodes 1994-2006 et 2006-2013. En effet, durant la période 1994-2006, les cas de microsporidiose intestinale étaient majoritairement rencontrés chez les patients infectés par le VIH et en stade V de SIDA (18 sur 26 patients) ; pour seulement un cas chez un patient immunodéprimé thérapeutique. A partir de 2006 jusqu'en mai 2013, la majorité des cas ont été diagnostiqués chez des patients greffés et donc immunodéprimés thérapeutiques (7 patients sur 10) ; pour un cas chez un patient infecté par le VIH. Cette inversion est probablement due à l'évolution des traitements antirétroviraux dirigés contre le VIH qui ont permis une restauration importante de l'immunité et donc un nombre de lymphocytes CD4 suffisant pour éviter les infections à microsporidies. En revanche, le nombre de greffés a augmenté ces dernières années et par conséquent, le nombre de patients sous immunosuppresseurs ce qui explique l'augmentation du nombre de cas de microsporidiose intestinale dans cette population de patients.

2-2- Méthodes de diagnostic utilisées au CHU de Rouen

2-2-1- Prélèvements

Deux types de prélèvements sont réalisables :

- selles fraîches ou conservées dans l'eau formolée à 10 %
- biopsie duodénale ou du grêle (exceptionnel)

L'examen direct entre lame et lamelle:

- absence de leucocytes et d'hématies
- les microsporidies ne sont pas identifiables, leur taille est de l'ordre du micron, contrairement aux coccidies (*Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora*) dont la taille varie de 5 à 30 μm .

2-2-2- Examen microscopique après coloration

2-2-2-1- Pour les biopsies

Pour les biopsies, le laboratoire de Parasitologie du CHU de Rouen utilise :

- May-Grünwald Giemsa (MGG)
- Fluorochromes: CalcoFluor[®] ou Uvitex[®] (LDBIO Diagnostics)

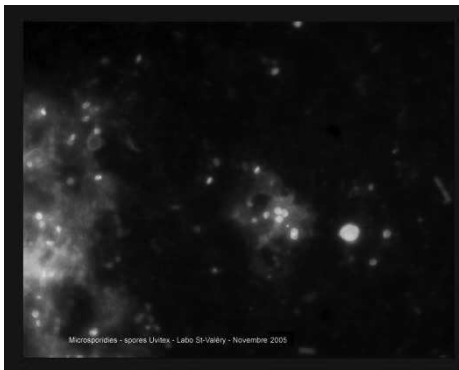


Figure 13 - Microsporidies mise en évidence par l'Uvitex

2-2-2-2- Pour les selles

Pour les selles, le laboratoire utilise :

- Trichrome modifié de Weber, qui est une technique longue, 2 à 4 heures environ et pour laquelle, la lecture des lames s'effectue en lumière blanche.

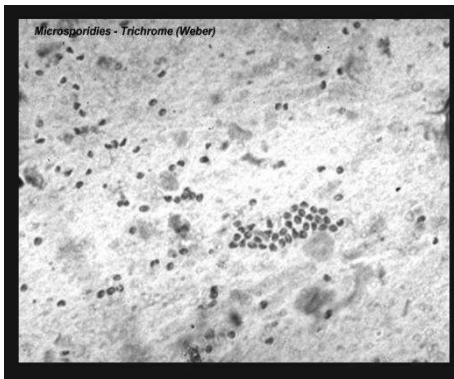


Figure 14 - Microsporidies traitées par le trichrome de Weber modifié

- Fluorochromes: technique dite de Van Gool

Technique rapide (15 mn), la lecture nécessite une lumière violette (longueur d'onde d'excitation entre 355 et 425 nm).

Lecture assez difficile car le fluorochrome met en évidence la chitine (les éléments fongiques, la cellulose et certaines bactéries sont marquées).

Technique plus sensible que le trichrome de Weber modifié.

Le mode opératoire de recherche des microsporidies par la technique de Van Gool est développé en annexe.

❖ Lecture:

Les microsporidies apparaissent comme des éléments arrondis ou ovoïdes souvent irréguliers de 1 à 2 μm présentant une fluorescence verte sur fond noir à rouge. La fluorescence est surtout marquée à la périphérie et souvent sur un axe longitudinal traversant les microsporidies.

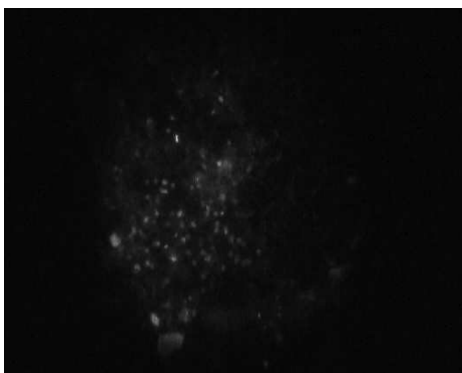


Figure 15 - Microsporidies au grossissement x 400 par la technique de Van Gool (D. Leméteil)

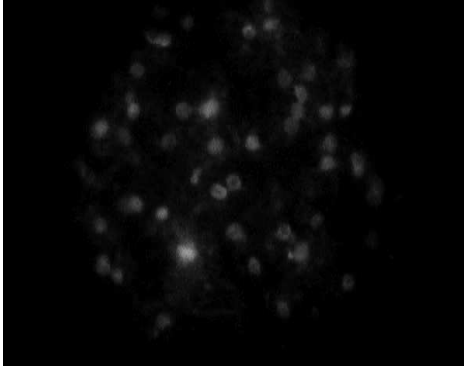


Figure 16 - Microsporidies au grossissement x 1000 par la technique de Van Gool (D. Leméteil)

NB: En cas de positivité sur 2 puits contigus, les 2 selles seront contrôlées dans une nouvelle série sur 2 puits séparés par un puits vide.

Tout dépistage positif en technique de Van Gool est contrôlé par la technique d'immunofluorescence à partir du flacon de selle primaire.

❖ Diagnostic différentiel

- Les clostridies :

Elles sont plus grosses que les microsporidies (2 à 3 fois), souvent en navette et en chaînettes

- Les bactéries:

La fluorescence est homogène dans toute la bactérie, les formes sont plus régulières et la taille plus petite.

- Des éléments d'origine végétale:

La fluorescence est souvent beaucoup plus forte qu'avec les microsporidies, les éléments sont généralement ovoïdes et parfois contenus dans des "sacs" ou dans un fin réticulum fluorescent.

❖ Expression des résultats:

Résultat négatif:

Recherche de microsporidies par la technique de Van Gool: Négative

Résultat positif:

Recherche de microsporidies par la technique de Van Gool:

En fonction du nombre de parasites observés:

< 10 pour 50 champs: très rares

10 à 50 pour 50 champs: rares

1 à 5 par champ: quelques

6 à 10 par champ: nombreuses

> 10 par champ: nombreuses

2-3- Présentation des patients transplantés rénaux infectés par des microsporidies

	cas 1	cas 2	cas 3	cas 4	cas 5
Greffé depuis	12 ans	12 ans	10 ans	9 ans	1 an
Antécédents de diarrhées	non	non	non	Non	non
Lymphopénie	oui (155 CD4/mm3)	non	Non renseigné	Non renseigné	oui
Prograf®	oui (2 mg par jour)	oui (2 mg par jour)	oui (1 mg par jour)	oui (6 mg par jour)	oui (3 mg par jour)
Cellcept®	oui (1 g par jour)	oui (1 g par jour)	oui (1,5 g par jour)	oui (1 g par jour)	oui (500 mg par jour)
Corticoides	non	non	oui (10 mg par jour)	Non	oui (7,5 mg par jour)
Fièvre	non	non	non	Non	non
Vomissements	non	non	oui	Non	oui
Diarrhées	oui	oui	oui	Oui	oui
Nombre de selles par jour	2	5 à 6	10	2	Non renseigné
Espèce en cause	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>
Délai entre troubles et le diagnostic	3 mois	3 mois	9 mois	1 mois	15 jours
Traitement utilisé	fumagilline	fumagilline	nitazoxanide	fumagilline	fumagilline
Dosage	20 mg	20 mg	1 g	20 mg	20 mg
Posologie	3 fois par jour	3 fois par jour	2 fois par jour	2 fois par jour	2 fois par jour
Durée de traitement	14 jours	11 jours	29 jours	14 jours	7 à 14 jours
Effets indésirables traitement	Thrombopénie	Thrombopénie	non	Non	Thrombopénie
		ALAT 2,5 fois la normale			
Délai d'apparition effets indésirables avec le nitazoxanide	12 jours	11 jours	Non concerné	Non concerné	7 jours
Changement de traitement	oui (par nitazoxanide)	non	non	nitazoxanide	non
Délai de guérison	3 jours	15 jours	5-10 jours	2 jours	Non renseigné

Figure 17 - Tableau regroupant les 5 cas diagnostiqués au service de néphrologie de Rouen de 1994 à 2013

Les points communs chez ces 5 patients sont :

- Absence d'antécédents de diarrhée
- Traitement par Prograf® et Cellcept®
- Absence de fièvre
- Diarrhée
- Microsporidie en cause : *Enterocytozoon bienewisi*

Pour 4 cas sur 5, la greffe datait d'environ une dizaine d'années et le délai entre l'apparition des troubles et le diagnostic était de quelques mois.

Pour les 4 patients traités par la fumagilline, 3 ont subi un effet indésirable majeur : une thrombopénie pour laquelle 2 patients ont dû interrompre leur traitement par fumagilline, remplacé par le nitazoxanide. Cet effet indésirable survient à partir de la deuxième partie du traitement.

Le délai entre l'instauration du traitement et l'amélioration des symptômes est variable suivant les patients.

Cette étude nous confirme qu'*Enterocytozoon bieneusi* est l'espèce de microsporidie la plus fréquemment retrouvée chez l'Homme.

2-4- Discussion

2-4-1- Limites de l'étude

Une des limites certaines de cette étude de cas est le faible nombre de patients qui ont pu être inclus.

Par ailleurs, le caractère rétrospectif de ce type d'étude expose à ne pas retrouver certaines données, concernant le patient et son suivi médical, qui n'ont pas été systématiquement reportées sur le dossier papier consulté. Certains résultats d'examens biologiques n'ont ainsi pas pu être retrouvés pour plusieurs patients ainsi que le délai de guérison pour un des patients inclus.

2-4-2- Analyse des résultats

2-4-2-1- Concernant le groupe de patients inclus

Pour tous les patients sauf un, il s'agissait de patients transplantés depuis une dizaine d'années au moment où a été diagnostiquée leur infection intestinale à microsporidies. On peut émettre l'hypothèse que le traitement au très long court (indispensable) rend les patients beaucoup plus vulnérables vis-à-vis du pathogène du fait d'un système immunitaire de plus en plus réprimé.

L'ensemble des patients n'avait jamais eu d'antécédents de diarrhées.

Les patients étaient tous traités par Prograf® et Cellcept® à différents dosages. Le Cellcept® et le Prograf® rendent les patients sensibles à ce pathogène à cause de leur mécanisme d'action développé ci-dessous.

Le mycophénolate mofétil (Cellcept[®]), classé dans les immunosuppresseurs sélectifs, est l'ester 2-morpholinoéthyle de l'acide mycophénolique (MPA). Le MPA est un puissant inhibiteur sélectif, non compétitif et réversible de l'inosine monophosphate déshydrogénase ; il inhibe donc, sans être incorporé à l'ADN, la synthèse de novo des nucléotides guanine. Etant donné que la prolifération des lymphocytes B et T est essentiellement dépendante de la synthèse de novo des purines, et que d'autres types de cellules peuvent utiliser des voies métaboliques « de suppléance », le MPA a un effet cytostatique plus marqué sur les lymphocytes que sur les autres cellules. [20] Donc, les lymphocytes ne remplissent plus leur rôle, rendant les patients susceptibles à la microsporidiose.

Le tacrolimus (Prograf[®]) est un inhibiteur de la calcineurine, au niveau moléculaire dont les effets semblent être induits par la liaison à une protéine cytosolique (FKBP12) responsable de l'accumulation intracellulaire du produit. De manière spécifique et compétitive, le complexe FKBP12-tacrolimus se lie à la calcineurine et l'inhibe conduisant à une inhibition calcium-dépendante du signal de transduction des lymphocytes T en empêchant ainsi la transcription d'une partie des lymphokines. Il inhibe notamment la formation des lymphocytes cytotoxiques qui sont principalement responsables du rejet du greffon. Le tacrolimus supprime l'activation des lymphocytes T et la prolifération T-dépendante des lymphocytes B, ainsi que la production de lymphokines (telles que les interleukines-2 et -3 et l'interféron- γ) et l'expression du récepteur de l'interleukine-2. [20] Cela conduit à l'inefficacité des lymphocytes T pour lutter contre les microsporidies.

La quasi-totalité des patients greffés rénaux étant traités par Prograf[®] et Cellcept[®], l'hypothèse d'une inhibition spécifique, par ces molécules, de voies d'activation des lymphocytes T qui seraient particulièrement impliquées dans la réponse anti-parasitaire est difficile à vérifier. La relative rareté de la microsporidiose au sein de la population de patients transplantés rénaux empêche toute étude ayant pour but de comparer son incidence dans des sous-groupes de patients recevant des types de traitements immunosuppresseurs différents. Il est possible que la susceptibilité des patients à l'infection parasitaire ne soit pas plus importante avec ces 2 molécules qu'avec d'autres traitements immunosuppresseurs. Néanmoins, il est certain que leur grande efficacité, propre à bloquer les mécanismes effecteurs impliqués dans le rejet du greffon, a un lien direct avec la susceptibilité des patients traités à cette infection intestinale.

2-4-2-2- Concernant le diagnostic

Le délai entre le début des troubles et le diagnostic est très important pour 3 des patients, variant de 3 à 9 mois.

Pour les 2 autres patients, le délai est plus faible, entre 15 jours et 1 mois.

En effet, les investigations parasitologiques ne font pas toujours partie du bilan initial lors d'une diarrhée et elles sont non rarement réalisées en dernier recours quand aucune étiologie n'a pu être mise en évidence. Chez un patient greffé rénal, lors d'une diarrhée sans fièvre inexpliquée, il faudrait avoir le réflexe de faire pratiquer des examens parasitologiques en même temps que les autres explorations à visée microbiologique (virologie, bactériologie) et/ou pharmacologique (dosage sanguin des médicaments immunosuppresseurs). Nous recommandons que les microsporidies doivent être recherchées comme agents potentiels responsables de diarrhée aiguë ou chronique dans cette population de patients, surtout si aucun autre organisme n'a été identifié.

2-4-2-3- Concernant le traitement

La thrombopénie est très fréquente (3 sur 4) chez les patients de notre étude qui ont reçu de la fumagilline.

L'augmentation supérieure à 2,5 fois la normale des ALAT a été constatée chez 1 patient sur 4.

Les effets indésirables avec la fumagilline apparaissent à partir de la deuxième semaine de traitement.

Au vue de la toxicité de la fumagilline, il serait judicieux de trouver une alternative thérapeutique comme l'association (citée ci-dessus dans le paragraphe sur les traitements) de fluoroquinolones avec la fumagilline, qui peut-être administrée à des doses non toxiques dans ce cas. Néanmoins, cette association a été testée *in vitro* chez *Encephalitozoon intestinalis* mais pas chez *Enterocytozoon bieneusi*. [6]

La fumagilline pourrait également être remplacée par le nitazoxanide qui n'a pas d'effets indésirables majeurs. La bonne tolérance de cette molécule permet des durées de traitement plus longues, traitement éventuellement concomitant avec une baisse du niveau d'immunodépression, jusqu'à la clairance totale du parasite. Mais, l'absence d'étude randomisée évaluant la réelle efficacité de cette molécule (et l'impossibilité de mettre en œuvre ce type d'études du fait de la faible incidence de l'infection), ne permet pas au clinicien de l'utiliser en toute confiance, en lui garantissant une issue favorable.

2-4-2-4- Suivi de la maladie

Lors de la découverte de la microsporidiose intestinale chez un transplanté rénal, le dosage du traitement immunosuppresseur a un intérêt afin de déterminer un éventuel surdosage

ayant pu favoriser la survenue de l'infection. Une adaptation posologique du traitement antirejet pourrait alors être réalisée.

Plusieurs études ont montré les effets bénéfiques des probiotiques dans la réduction de la durée et de la gravité d'infections intestinales causées par *Cryptosporidium* ou *Giardia*. [24,25] Devant le besoin urgent d'un médicament sûr et efficace contre la microsporidiose, particulièrement chez les individus immunodéprimés, et dans l'espoir d'étendre l'indication de certains probiotiques contre cet autre eucaryote unicellulaire, des travaux de recherche dans le but d'établir une réelle efficacité clinique des probiotiques sont nécessaires. [26]

Les examens parasitologiques des selles doivent être réalisés régulièrement tant que dure la symptomatologie diarrhéique afin d'évaluer l'évolution de la charge parasitaire sous traitement. Une fois obtenue la résolution de la diarrhée, ces examens, lors du suivi régulier du patient, le clinicien prescrira, au moindre doute sur une rechute clinique, un examen des selles en n'oubliant jamais de préciser sa demande par rapport à la recherche spécifique des microsporidies.

Conclusion

Ce travail souligne que la microsporidiose reste une pathologie peu fréquente et de ce fait, également méconnue, non systématiquement évoquée devant un tableau de diarrhée et par conséquent diagnostiquée tardivement. Des améliorations peuvent être apportées, notamment en terme de rapidité de diagnostic, en effet, il pourrait être effectué de façon systématique un examen parasitologique des selles avec les autres explorations biologiques chez les patients transplantés rénaux présentant une diarrhée sans fièvre.

Il paraît difficile d'éviter qu'une infection par les microsporidies devienne préoccupante chez les greffés rénaux c'est à dire que la diarrhée ne devienne chronique et entraîne un risque de déshydratation pouvant mettre en jeu le pronostic fonctionnel du greffon. En effet, c'est avant tout l'efficacité de la réponse immunitaire cellulaire, à savoir un nombre de LT CD4+ fonctionnels suffisant, qui va permettre de contrôler le développement des microsporidies et c'est cette réponse cellulaire que l'on cherche à atténuer chez les transplantés par le traitement anti-rejet. Toute restauration de cette immunité cellulaire par diminution du traitement immunosuppresseur exposant les patients à un rejet de greffe, un diagnostic et une prise en charge spécifiques rapides devraient permettre une meilleure réponse au traitement antiparasitaire dans un délai court permettant son interruption avant de voir apparaître ses effets secondaires. Dans ce contexte, il est évident que le développement de méthodes diagnostiques sensibles comme le sont les techniques de biologie moléculaire prennent tout leur intérêt.

Une étude évaluant l'incidence de la microsporidiose chez des patients regroupés selon le type de traitements immunosuppresseurs qu'ils reçoivent et en analysant les résultats en les stratifiant sur leur statut immunitaire, bien que difficile à mettre en place du fait du faible nombre de patients qui pourraient y être inclus serait concevable que sous la forme d'une étude multicentrique impliquant de nombreux services prenant en charge des transplantés rénaux. Ce type d'études pourrait améliorer les connaissances sur l'impact des molécules immunosuppressives par rapport au risque de microsporidiose et pourrait apporter des informations sur la conduite à tenir, en cas de diarrhée à microsporidies, éventuellement en privilégiant certains traitements anti-rejets plutôt que d'autres.

Bibliographie

- [1] Desportes-Livage I., Datry A. (2005). Infections à microsporidies, Isospora et Sarcocystis. *EMC-Maladies infectieuses*, 2 : 178-196.
- [2] Desportes-Livage I. (2000). *Biology of Microsporidia*. Petry F (ed) : Cryptosporidiosis. Contributions to Microbiology. Basel, Karger, 6 : 140-165.
- [3] Drancourt M., Ridoux O. (2000). Bases expérimentales et cliniques du traitement des microsporidioses humaines. *Antibiotiques*, 2 : 23-29.
- [4] Brosson D. (2006). Analyse protéomique et caractérisation de nouvelles protéines de paroi chez *Encephalitozoon cuniculi*, une microsporidie pathogène de l'homme. Cellular Biology. Université Blaise Pascal - Clermont-ferrand II.
- [5] Bettens S., Gigi J., Delmée M. (1999). Les infections à microsporidies. *Louvain Médical*, 118 : 446-456.
- [6] Anane S., Attouchi H. (2010). Microsporidiosis : Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 34 : 450-464.
- [7] Deluol A. M., Cenac J. (1994). Les microsporidioses Microsporidiosis. *Annales de Biologie Clinique*, 52 : 37-44.
- [8] Hartskeerl R. A., Van Gool T., Schuitema A. R., Didier E. S., Terpstra W. J. (1995). Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*, 110 : 277-285.
- [9] Anane S., Attouchi H., Kaouech E., Belhadj S., Ben Chaabane T., Ben Abdallah N. *et al.* (2010). Caractéristiques épidémiologiques et cliniques de la microsporidiose intestinale chez les immunodéprimés à Tunis. *Cahiers D'études Et De Recherches Francophones / Santé*, 20 : 21-29.
- [10] Sarfati C., Liguory O., Derouin F. (2001) Les microsporidies. *La Presse Médicale*, 30 : 143-146.
- [11] Mougeot G. (2001). Infections à protozoaires et environnement. *Revue Française Des Laboratoires*, 2001 : 25-31.
- [12] Khan I. A., Moretto M., Weiss L. M. (2001). Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes and Infection Journal*, 3 : 401-405.
- [13] Salat J., Jelinek J., Chmelar J., Kopecky J. (2008). Efficacy of Gamma Interferon and Specific Antibody for Treatment of Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 : 2169-2174.

- [14] Bouladoux N. (2003). Rôle de l'interféron- γ (IFN- γ) dans l'immunité cellulaire anti-microsporidienne. Etude du modèle de la souris déficiente pour le récepteur à l'IFN- γ , infectée oralement avec la microsporidie *Encephalitozoon intestinalis*. *Immunology*. Université Pierre et Marie Curie – Paris VI.
- [15] Ghosh K., Weiss L. M. (2012). T cell response and persistence of the microsporidia. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 : 748-760.
- [16] Abdelmalek R., Anane S., Chabchoub N., Essid R., Aoun K., Ben Chaabene T. *et al.* (2011). Co-infection par des microsporidies et des cryptosporidies chez un nouveau né infecté par le VIH. *Archives de Pédiatrie* 2011, 18 : 562-564.
- [17] Hutin Y. J., Sombardier M. N., Liguory O., Sarfati C., Derouin F., Modaï J. *et al.* (1998). Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *The Journal of Infectious Diseases*, 178 : 904-907.
- [18] Chabchoub N., Abdelmalek R., Issa S., Kanoun F., Ben Chaabene T., Bouratbine A. *et al.* (2012). Apport de la PCR dans la recherche et l'identification des microsporidies intestinales chez les sujets infectés par le VIH. *Pathologie Biologie*, 60 : 91-94.
- [19] Anane S., Kaouech E., Belhadj S., Abdelmalek R., Ammari L., Ben Othman T. *et al.* (2011). Identification d'*Enterocytozoon bienewasi* par PCR dans les selles des patients immunodéprimés tunisiens. *Pathologie Biologie*, 59 : 234-239.
- [20] Vidal. (2013). *Dictionnaire Vidal*. Issy-les-moulineaux, Vidal, 898-899.
- [21] Romark Pharmaceuticals. (2005). Alinia (nitazoxanide) tablets and Alinia for oral suspension prescribing information. Tampa, FL.
- [22] White C. A. Jr. (2004). Nitazoxanide : a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2 : 43-49.
- [23] Didier P. J., Philips J. N., Kuebler D. J., Nasr M., Brindley P. J., Stovall M. E., *et al.* (2006). Antimicrosporidial activities of Fumagillin, TNP-470, Ovalicin and Ovalicin derivatives in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 : 2146-2155.
- [24] Waters W. R., Harp J. A., Wannemuehler M. J., Carbajal N. Y., Casas I. A. (1999). Effects of *Lactobacillus reuteri* on *Cryptosporidium parvum* infection of gnotobiotic TCR- α -deficient mice. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46 : 60-61.
- [25] Shukla G., Sidhu R. K. (2011). *Lactobacillus casei* as a probiotic in malnourished *Giardia lamblia*-infected mice. a biochemical and histopathological study. *Canadian Journal of Microbiology*, 57 : 127-135.
- [26] Mossallam S. F., Amer E. I., Diab R. G. (2014). Potentiated anti-microsporidial activity of *Lactobacillus acidophilus* CH1 bacteriocin using gold nanoparticles. *Experimental Parasitology*, 144 : 14-21.

ANNEXE I

Techniques de Vanqool

❖ Réactifs:

Stockés à 2-8°C:

- Bleu Evans
- Tampon PBS pH 7,4 ou 7,2 sans merthiolate (Type PBS Biomérieux).
- Uvibio (Biotrin réf 2B100)
- Solution de travail d'Uvibio (dans un tube à hémolyse bouché):

Uvibio: 0,4 ml

Tampon PBS: 3,6 ml

Ne pas exposer à la lumière.

Stockés à 2-8°C:

- Suspension formolée de selle positive, la suspension se conserve plusieurs années à 2-8°C.

❖ Principe:

L'uvitex est un fluorochrome à affinité sélective pour la chitine

❖ Mode opératoire

➤ Préparation de la suspension de selles:

- Selles liquides

Prélever environ 1 ml de selles (préalablement homogénéisées) à l'aide d'une pipette de transfert de gros diamètre et transvaser dans un tube à hémolyse plastique et contenant 1 ml de formol à 4%.

- Selles molles ou moulées

Prélever l'équivalent d'un petit pois de selles à l'aide d'une anse plastique de 10 µl (bleue- réf: Sarstedt n°86.1562050), homogénéiser dans un tube à hémolyse plastique et contenant 1 ml de formol à 4%.

Si la selle est dure, la dilacérer contre la paroi du tube à l'aide d'une anse.

La suspension est homogénéisée au vortex puis conservée à 4°C jusqu'à l'étape de coloration.

Technique:

- *Homogénéiser les suspensions de selles au Vortex.*
- *Déposer 1 µl de suspension de selles à l'aide d'une anse blanche de 1 µl (réf 86.1567.050- Sartstedt) sur la totalité d'un puits d'une lame à fluorescence à 8 puits. Faire de même avec la selle servant de témoin positif.*
- *Laisser sécher à l'air.*
- *Fixer les lames 3 min au méthanol- sécher-*
- *Déposer sur toute la surface du puits, à l'aide d'une pipette de transfert, une goutte d'Uvibio® dilué au 1 /10 dans le PBS.*
- *Laisser 10 mn à l'abri de la lumière*
- *Rincer dans le PBS 10 fois 1 seconde.*
- *Passer directement sans sécher dans le bleu Evans dilué à 0,5% dans PBS 7,2 ou 7,4 (soit 150 µl dans 30 ml de PBS (flacon à ECBU)) pendant 30s.*
- *Rinçage en PBS 10 fois 1 seconde.*
- *Séchage à l'air (sèche-cheveux).*
- *Si observation différée, garder les lames à l'abri de la lumière.*
- *Ne pas monter les lames*
- *Observer au microscope à épifluorescence.*
- *Regarder à l'objectif x 100 à immersion en lumière violette (excitation entre 355 et 425nm).*

ANNEXE II

PCR conventionnelle : [18]

Préparation de l'échantillon pour la PCR conventionnelle :

Les selles sont conservées à -20°C dans un tampon Phosphate-buffered-saline (PBS), à pH 7,2. Le ratio de selles/PBS est de respectivement 1/3 et 2/3. Réalisation de trois lavages au PBS avec centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 minutes. Ajout de 50 µl de Cétylméthylammonium bromide à 2 % au culot.

Extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN est effectuée avec le Kit QI Amp tissue et l'ADN est conservé à -20°C.

Amplification :

*Les amorces universelles V1 et PMP2 ont été choisies pour amplifier un fragment du gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 16S des microsporidies. La taille de ce fragment varie selon l'espèce en cause : 250 pb pour *Enterocytozoon bienewisi* et 268 à 279 pb pour le genre *Encephalitozoon*. L'amplification s'effectue dans un volume final de 50 µl. L'enzyme utilisée est la Taq Gold DNA Polymerase à une concentration de 1,25 unité par tube. Le mélange réactionnel comprend 5 µl de tampon 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs et 20 pmol de chaque amorce et 10 µl d'ADN extrait. Le programme d'amplification est composé de 35 cycles d'amplification de 45 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 45 secondes à 72°C. Le dernier cycle a une phase d'extension finale de 5 minutes à 72°C.*

Révélation des produits d'amplification :

La révélation se fait par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % ; 10 µl de chaque produit d'amplification mélangé avec le bleu d'échantillon sont mis à migrer sur le gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium dans un tampon tris, Borate, EDTA. L'ADN amplifié est visualisé sous rayonnement UV.

SERMENT DE GALIEN

Je jure 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.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



DUMORTIER Delphine

La microsporidiose intestinale : diagnostics réalisés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de 1994 à 2013 et étude des cas chez les transplantés rénaux du service de Néphrologie du CHU de Rouen.

Th. D. Pharm., Rouen, 2015, 60 p.

RESUME

La microsporidiose intestinale humaine fut identifiée lors de la pandémie de SIDA dans les années 1980. Cette pathologie est une infection opportuniste qui se développe chez les personnes immunodéprimées en particulier les patients atteints de SIDA et les patients transplantés. Les deux espèces principales pathogènes chez l'Homme en cause sont *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis*.

Cette pathologie se transmet par voie oro-fécale, avec pour principal signe clinique la diarrhée. Cette infection est spontanément résolutive chez l'immunocompétent mais des formes graves et parfois même disséminées peuvent se rencontrer en cas d'immunodépression sévère.

Les traitements actuellement disponibles sont l'albendazole, le traitement de choix pour les microsporidioses intestinales, oculaires et disséminées dues au genre *Encephalitozoon*, la fumagilline, qui a de nombreux effets indésirables graves et fréquents, utilisée pour traiter *Enterocytozoon bieneusi* et le nitazoxanide, qui bénéficie d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative en France, qui permet également de traiter *Enterocytozoon bieneusi* et serait efficace *in vitro* sur *Encephalitozoon intestinalis*.

Ce travail se divise en deux parties, en premier lieu est fait un rappel sur l'agent causal, son cycle de développement, ses conséquences pathologiques, le diagnostic et le traitement de la microsporidiose intestinale. La seconde partie détaille la pratique du diagnostic biologique et les patients en ayant bénéficié au CHU de Rouen et dans cette partie, nous décrivons plus particulièrement cinq observations de microsporidiose chez des patients transplantés rénaux pris en charge dans le service de Néphrologie du CHU de Rouen.

MOTS CLES : *Encephalitozoon intestinalis* - *Enterocytozoon bieneusi* - Microsporidiose intestinale - Transplantation rénale – Diarrhée - Immunodépression

JURY

Président : M. GARGALA Gilles

Membres : Mme LE GOFF Laetitia

M. BERTRAND Dominique

M. DULONDEL Yann

Mme DRIFI Hanane

DATE DE SOUTENANCE : 7 Juillet 2015