



HAL
open science

Microsporidies communes à l'homme et aux animaux : étude bibliographique

Marie Deverrière

► To cite this version:

Marie Deverrière. Microsporidies communes à l'homme et aux animaux : étude bibliographique. Médecine vétérinaire et santé animale. 2003. <dumas-04644703>

HAL Id: dumas-04644703

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04644703v1>

Submitted on 11 Jul 2024

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

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



HAL Authorization

MICROSPORIDIES COMMUNES A L'HOMME ET AUX ANIMAUX : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Marie, Anne, Madeleine DEVERRIERE

Née, le 26 septembre 1977 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE**

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-François MAGNAVAL

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

M. Jacques DUCOS de LAHITTE

M. Jean-Yves JOUGLAR

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Toulouse, 2003

NOM : DEVERRIERE

PRENOM : Marie

TITRE :

Microsporidies communes à l'Homme et aux Animaux: étude bibliographique.

RESUME :

Les Microsporidies sont des organismes de type eucaryote, parasites obligatoires intracellulaires, qui infectent une grande variété d'Invertébrés et de Vertébrés, parmi lesquels Poissons, Oiseaux et Mammifères, dont l'Homme.

Elles ont été reconnues comme agents opportunistes émergents depuis le début de l'épidémie du SIDA, mais étaient connues auparavant chez certains animaux.

Cette thèse a pour objet de rapporter les connaissances actuelles en ce qui concerne la biologie et l'épidémiologie de ces organismes, les interactions avec leur hôte, les maladies qu'elles provoquent, ainsi que leur diagnostic et leur traitement, chez l'homme et chez les animaux.

MOTS-CLES :

Microsporidies, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, zoonose, homme, pathogènes opportunistes, Sida, immunodépression.

ENGLISH TITLE :

Microsporidia by Man and Animals: a review.

ABSTRACT:

Microsporidia are obligate, intracellular, spore-forming eukaryotes, which infect a wide range of hosts in invertebrate and vertebrate animals: fish, birds and mammals, including man.

They are recognized as emerging opportunistic pathogens in patients with Aids, though they were known before in some animals.

This review's aim is to report what is known about biology and epidemiology of these organisms, the relations with their hosts, the clinical diseases and their diagnosis and treatment, by men and by animals.

KEY WORDS :

Microsporidia, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, zoonosis, man, opportunistic pathogens, Aids, immunodepression.

**Microsporidies communes à l'Homme et aux
Animaux: étude bibliographique**

Remerciements

*A notre président de thèse, Monsieur le Professeur Magnaval
Professeur des Universités
Praticien hospitalier, Parasitologie*

*Qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de mon
profond respect.*

*Au directeur de thèse, Monsieur le Professeur Ducos de Lahitte,
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Parasitologie et maladies parasitaires*

*Qui a accepté d'assurer la direction de cette thèse et y a consacré
un temps précieux.
Veuillez accepter mes sincères remerciements.*

*A Monsieur le Docteur Jouglar,
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de
Toulouse,
Pathologie du bétail et des animaux de basse-cour.*

*Qui a accepté de faire partie de ce jury de thèse.
Veuillez accepter mes sincères remerciements.*

A mes parents et Béatrice,
A ma famille,
A mes amis,
Je ne leur ai jamais assez dit combien je les aimais.

Table des matières

Liste des illustrations

Introduction

1. Caractères généraux des Microsporidies communes à l'homme et à l'animal

1.1. Historique expérimental

1.2. Classification générale des Microsporidies

1.2.1. Phylum des Microspora

1.2.2. Tableau de classification des microsporidies communes à l'homme et aux animaux

1.2.3. Présentation des espèces rencontrées chez l'homme

1.3. Morphologie

1.4. Cycle

1.4.1. Caractères biologiques

1.4.2. Phases du cycle

1.4.3. Particularités des Microsporidies rencontrées chez l'homme

1.5. Méthodes d'exploration des Microsporidies

1.5.1. Utilisation de lignées cellulaires

1.5.2. Utilisation de modèles animaux

1.5.3. Modèles utilisés selon l'espèce

1.6. Epidémiologie

A. Données épidémiologiques

1. Chez l'homme

1.1. Chez les personnes immuno-déprimées

Malades du Sida, personnes âgées

1.2. Chez les personnes immunocompétentes

Pays développés ou en développement

2. Chez les animaux: chien, lapin, oiseaux, animaux de rente

3. La question du réservoir naturel, controverses

B. Modes de contamination

1. Horizontale

2. Verticale

C. Etiologie générale des microsporidioses

1.7. *Potentiel zoonotique des Microsporidies*

1.7.1. *E. cuniculi*

1.7.2. *E. bienewisi*

1.7.3. *E. hellem*

1.7.4. Autres microsporidies

1.7.5. Notes sur la notion de spécificité d'hôte

1.8. *Immunologie:*

1.8.1. Interaction hôte-parasite

1.8.2. Rôle de l'immunité à médiation cellulaire

1.8.3. Rôle de l'immunité à médiation humorale

2. Microsporidioses de l'homme et de l'animal

2.1. *Microsporidioses humaines*

2.1.1. Infection du tractus gastro-intestinal

2.1.2. Infection du tractus biliaire

2.1.3. Hépatite, péritonite

2.1.4. Infection oculaire

2.1.5. Sinusite

2.1.6. Infection pulmonaire

2.1.7. Infection du tractus urinaire

2.1.8. Myosite

2.1.9. Infection cérébrale

2.1.10. Manifestations rares

2.1.11. Infections disséminées

2.2. *Microsporidioses animales*

2.2.1. Chez les Insectes

2.2.2. Chez les Poissons

2.2.3. Chez les Oiseaux

- Psittacidés domestiques

- Autres oiseaux domestiques

- Oiseaux sauvages

2.2.4. Chez les mammifères domestiques

- Chien et chat

- Lapin

2.2.5. Chez les animaux de laboratoire

3. Diagnostic

3.1. Diagnostic différentiel

3.2. Méthodes de diagnostic

- 3.2.1. Prélèvements et examens complémentaires
- 3.2.2. Recherche de spores par coloration
- 3.2.3. Méthodes sérologiques
- 3.2.4. Méthodes moléculaires

4. Traitement et prophylaxie

4.1. Molécules disponibles

4.2. Prévention et traitement de l'homme

- 4.2.1. Traitement des infections par *Encephalitozoon* spp.
- 4.2.2. Cas particulier des infections par *Enterocytozoon bieneusi*

4.3. Prophylaxie et traitement des lapins

5. Perspectives

5.1. Parallèle entre Microsporidies et SIDA: intérêts divergents entre Nord et Sud

5.2. Développement des méthodes de diagnostic et des traitements

5.3. A la recherche des sources: un rôle pour les vétérinaires

Conclusion générale

Bibliographie

Table des illustrations

Tableaux:

Tableau de classification des Microsporidies communes à l'Homme et aux animaux.....	14
Tableau de pathogénicité chez l'Homme ..	37

<u>Clichés de microsporidies en microscopie électronique (MET) et en trois dimensions (SEM)</u> ..	16
--	----

Exemples

<u>III.1: Evolution de l'infection expérimentale par <i>E. intestinalis</i> chez des souris sans récepteur à l'interféron gamma</u> ..	36
<u>III.2: Cas de microsporidiose chez un lapin de compagnie</u> ..	46
<u>III.3: Exemple de protocole ELISA chez le lapin</u>	51
<u>III.4: Exemples de protocoles de test d'immunofluorescence</u>	52
<u>III.5: Exemple de protocole CIE</u> ..	53
<u>III.6: Exemple de protocole CIA</u> ..	53
<u>III.7: Exemple de processus de diagnostic complet de microsporidiose à <i>E. cuniculi</i> mis en œuvre chez un patient atteint de SIDA</u> ..	56

Introduction

Les Microsporidies sont des organismes de type eucaryote, parasites obligatoires intracellulaires, qui infectent une grande variété d'Invertébrés et de Vertébrés, parmi lesquels Poissons, Oiseaux et Mammifères, dont l'Homme.

Alors que les Microsporidioses humaines étaient, jusqu'à il y a une vingtaine d'années, rapportées de manière anecdotique, et qu'on étudiait et connaissait bien la microsporidiose du lapin, l'épidémie de Sida a provoqué une augmentation significative de cette maladie. Les Microsporidies ont été alors reconnues comme agents opportunistes émergents.

Quels sont ces parasites restés dans le domaine animal jusqu'à dernièrement, quelle est leur variété, leur biologie, les techniques permettant de les étudier? Leur épidémiologie est encore peu connue, existe-il un passage possible entre espèces, ce qui en ferait des agents zoonotiques? Quelles sont les manifestations cliniques des diverses microsporidioses, chez l'Homme et chez l'Animal?

Quels sont les moyens de les dépister, sur le terrain et dans le domaine de la recherche? Peut-on s'en prévenir et guérir de leur infection?

Cette synthèse bibliographique va tenter de répondre à ces questions, certaines réponses étant connues depuis longtemps des scientifiques, d'autres étant encore dans le domaine de l'expectative.

Ce travail a été de rassembler des données très fragmentées, car les sujets de recherche dans le domaine des Microsporidies sont en général très pointus, et les publications traitent de points isolés très précis. En effet, les microsporidies sont un sujet que l'on croyait connu, mais sa récente arrivée sur le devant de la scène médicale a mis en avant les incompréhensions multiples qui subsistaient.

Cette thèse a ainsi pour ambition de poser des bases théoriques qui permettront à des vétérinaires de s'impliquer plus en avant dans un domaine, où l'on verra qu'ils ont, en tant que garants de la santé publique, une place importante à tenir.

1. Caractères généraux des microsporidies humaines et animales

1.1. Historique expérimental [71, 9, 16, 60, 39, 28]

Les premières descriptions des *Microspora* en tant que pathogènes animaux datent de la fin des années 1920. On découvre peu de choses pendant les quarante années suivantes, mais de nombreux vétérinaires et pathologistes vétérinaires reconnaissent ces organismes en tant que pathogènes latents des animaux de laboratoire, particulièrement des lapins. Les microsporidies furent un agent de biais d'un grand nombre d'expériences, gênant la compréhension de maladies comme la polyomyélite ou les néoplasies [71, 60].

Certains articles parlent de microsporidies présentes dans des tumeurs animales transplantables. Des organismes, qui étaient probablement des microsporidies, sont propagés pour la première fois *in vitro* en 1959. La propagation continue *in vitro* et l'identification définitive du parasite furent rapportées pour la première fois en 1969.

Encephalitozoon cuniculi devient la microsporidie la mieux connue et la plus étudiée. Le séquençage complet de son génome a été achevé en 2001 [39].

En 1985, un nouveau genre et une nouvelle espèce, *Enterocytozoon bieneusi*, sont nouvellement identifiés chez des patients atteints du Sida. En 1991, c'est au tour de *Encephalitozoon hellem* et, en 1993, un troisième organisme humain est isolé, *Encephalitozoon intestinalis*.

Avant le début de l'épidémie de SIDA chez l'homme, seuls sept cas d'infestation de l'homme par des microsporidies avaient été décrits entre 1959 et 1985 [28]. Depuis, les microsporidies sont considérées comme pathogènes émergents, principalement en tant qu'agents d'infections opportunistes chez les personnes atteintes du Sida [9].

Le grand nombre d'articles publiés sur le sujet prouve l'importance accordée à ce parasite.

1.2. Classification générale des Microsporidies

Plus de 3000 espèces de Microsporidies ont été décrites selon Larsson [42]. Elles sont réparties en 144 genres et constituent le phylum des *Microspora*.

1.2.1. Phylum des Microspora [15, 42]

Il existe deux classes: les *Rudimicrosporea* (Sprague) et les *Microsporea* (Delphy), qui nous intéressent.

La classe des *Microsporea* contient deux ordres: les *Minosporea*, qui comportent 4 genres, sont plus petites (autour de 1 µm) et infectent des Invertébrés, et les *Microsporida*.

Les Microsporidies de l'ordre des *Microsporida* mesurent quelques microns, comportent 136 genres et plus de 1000 espèces. Elles infectent Protozoaires, Invertébrés (plus de 650 espèces) et Vertébrés: poissons, reptiles, oiseaux et mammifères, dont l'homme.

1.2.2. Tableau de classification des Microsporidies communes à l'homme et à l'animal [17] :

Ce tableau présente les espèces que l'on a rencontrées à la fois chez l'homme et chez des animaux.

Les plus fréquemment rapportées sont *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* et *Enterocytozoon bieneusi*. Elles ont plusieurs sous-types, dont certains n'ont été trouvés que dans une espèce animale, alors que d'autres sont communs à plusieurs.

Les diverses espèces moins fréquentes, rapportées de manière anecdotique chez l'homme, appartiennent aux genres *Brachiola*, *Microsporidium*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Thelohania*, *Trachipleistophora* et *Vittaforma*. Ces genres ont été retrouvés chez les animaux.

1.2.3. Présentation des espèces rencontrées chez l'homme [16, 60, 7, 32, 33, 18]

1. *Enterocytozoon bieneusi* affecte d'abord l'intestin grêle et le tractus biliaire des patients atteints de Sida, avec occasionnellement atteinte du tractus respiratoire [7]. De 30 à 50% de ces patients souffrent de diarrhée. Les lésions sont relativement légères. On observe un émoussage des villi intestinaux, un raccourcissement des cryptes et une infiltration lymphocytaire relativement modérée et diffuse de la *lamina propria*.

C'est la microsporidie la plus fréquente chez l'homme.

2. *Encephalitozoon intestinalis* touche le plus souvent l'intestin grêle et le tractus biliaire, même s'il peut, comme tout *Encephalitozoon*, se disséminer dans tout l'organisme [32, 33]. Contrairement à *E. bieneusi* qui se trouve rarement dans la *lamina propria*, ou alors sous forme dégénérée, *E. intestinalis* se réplique dans les macrophages de la *lamina propria*.

E. intestinalis produit une grande variété de symptômes. En plus des troubles intestinaux et biliaires, la néphrite est fréquente, avec nécrose et desquamation des cellules épithéliales tubulaires, inflammation interstitielle et masses parasitaires dans les lésions rénales. C'est la deuxième microsporidie la plus fréquente chez l'homme.

3. *Encephalitozoon hellem* a été pour la première fois isolé à partir de la cornée d'un patient atteint du sida et de kératite [16], mais il semble que ce soit surtout un pathogène respiratoire. Il se dissémine également dans l'organisme [18].

4. *Encephalitozoon cuniculi* a été décrit chez des patients atteints de sida [28], mais moins souvent que d'autres microsporidies. C'est le parasite qui se produit le plus spontanément chez divers animaux [24, 35, 50, 38], mais surtout chez le lapin.

Comme les autres membres du genre *Encephalitozoon*, ce parasite a une grande propension à la dissémination. On l'a trouvé seulement à deux reprises dans l'appareil digestif de patients atteints du sida, mais sans que ces patients ne présentent de la diarrhée [28].

5. Autres microsporidies: cf. tableau de classification, page suivante.

**Tableau de classification des Microsporidies communes à l'homme et aux animaux,
d'après [4, 9, 13, 17, 21, 37, 43, 51]**

2000, réf. 13	Hôtes naturels		Type d'infection	
Espèces fréquemment rapportées	Encephalitozoon cuniculi	Souche I, caryotypes A, B, C	disséminée	
		Souche II, caryotype F		
		Souche III, caryotypes D, E		
		Non classifiés		
	Encephalitozoon hellem	génotype 1	Lapin, souris, homme Renard bleu, souris Chien domestique, homme Nombreux, dont rat, cobaye, hamster, chevaux, vaches, vison, primates non humains perroquets, homme	disséminée, cornée, tractus respiratoire
		génotype 2	homme	
		génotype 3	homme	
	Encephalitozoon intestinalis	inconnus	Psittacidés	disséminée
			Homme, chien, porc, vache, chèvre, âne	
	Enterocytozoon bienewasi	génotypes A, B, C, Q	homme	Intestin grêle, tractus biliaire tractus respiratoire
génotypes D		homme, macaque?		
génotypes E, G, H, O, EbpD, EbpE		porc		
génotype F		porc, bétail		
génotypes I, J, M, N		bétail		
génotypes K, L, Ebfel A		chat		
génotype P		lama		
inconnu	chien domestique (1 cas)			
Espèces moins fréquentes	Brachiola vesicularum Brachiola connori Microsporidium africanum Microsporidium ceylonensis Nosema algerae Nosema ocularum Pleistophora sp. Theilachnia apodemi Trachipleistophora anthropophthera Trachipleistophora hominis Vittaforma corneae	homme	Stroma cornéen, muscle squelettique	
		homme	Disséminée	
		homme	Cornée	
		homme	Cornée	
		homme, moustique	Cornée	
		homme	Stroma cornéen	
		homme, poissons	Muscle squelettique	
		campagnol	Muscle squelettique, cerveau	
		homme	Disséminée	
		homme	Muscle squelettique, sinus nasaux	
		homme	Stroma cornéen	

1.3. Morphologie [23, 71]

Les Microsporidies sont en général de forme ovale, relativement petites, et leurs spores ne dépassent généralement pas 2-5 μm par 1-3 μm . Le caractère morphologique les définissant est la présence d'un filament ou tubule polaire.

Ces parasites sont eukaryotes, avec un noyau organisé et une enveloppe nucléaire.

Cependant, ils ont un ARN ribosomal de type prokaryote et n'ont ni mitochondries, ni péroxysomes, ni de véritable appareil de Golgi [71]. Il semble que le rôle essentiel de leur hôte soit de leur apporter de l'énergie.

Les parasites sporulent, et la spore est à la fois la forme qui survit dans l'environnement et l'agent infectieux transmissible d'un hôte à l'autre.

Les spores ont des caractères généraux communs, bien que leur taille et leur ultrastructure varient selon le genre: ils possèdent une paroi, un sporoplasme, une vacuole antérieure et une vacuole postérieure, ainsi que le filament polaire et son disque d'ancrage.

La paroi des spores ne comporte qu'une seule valve, chitineuse, de structure trilaminaire, comportant, de l'extérieur vers l'intérieur:

-une exospore, mince, parfois ornée, apparemment sans structure, mais pouvant être pluristratifiée, de nature protéique et contenant des acides aminés soufrés.

-une endospore, constituant la couche moyenne de l'enveloppe sporale, composée de chitine, associée à une protéine.

-une membrane interne, péricytoplasmique.

Le sporoplasme est relativement dense, uni- ou binucléé.

La vacuole antérieure (polaroplaste) occupe une grande partie de la spore. Elle apparaît lamellaire en microscopie électronique et les lamelles prennent leur origine dans un réticulum endoplasmique. Cette vacuole est capable de se gonfler considérablement lors de l'ouverture de la spore, ce qui aurait un rôle dans l'extrusion du filament polaire.

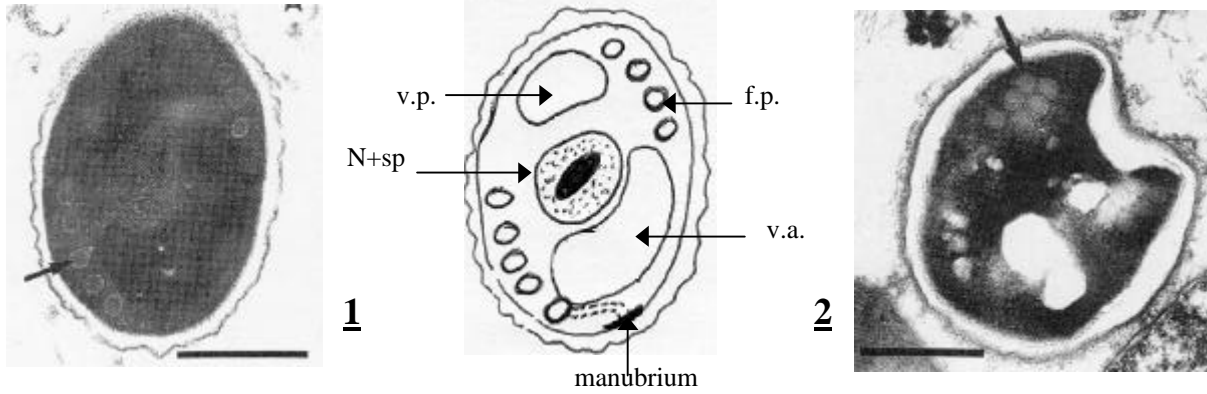
Le filament polaire, fixé à la face interne du pôle apical de la spore, sur un disque d'ancrage ou manubrium, est enroulé en spirale et occupe la quasi totalité de la spore. Ce filament est creux et composé de deux membranes. Il peut être très long et atteindre 500 micromètres et est dévaginable. Le nombre de tours de spirale est un critère de classification.

L'ensemble vacuole antérieure et filament polaire constitue l'appareil d'extrusion de la spore.

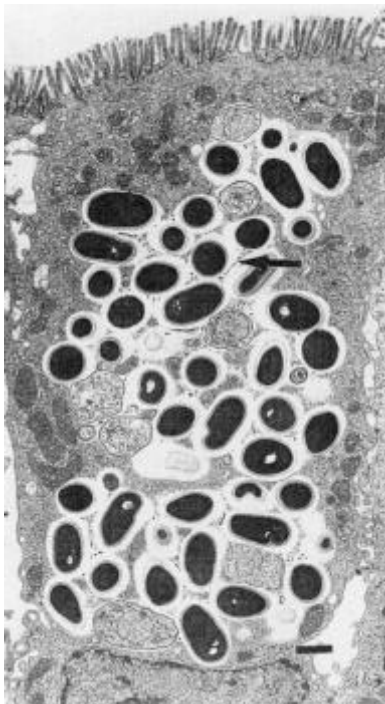
La vacuole postérieure est plus ou moins développée, et peut même être absente. Lorsqu'elle existe, le tubule polaire s'enroule sur elle; elle peut se dilater au moment de l'extrusion du tubule polaire.

Les éléments permettant de distinguer les différents genres sont la taille des spores, la morphologie et la configuration nucléaire des formes parasitaires successives, les stratégies de réplique employées et les interactions avec la cellule-hôte.

Récemment, des méthodes moléculaires et génétiques ont été employées avec succès en phylogénétique, soit pour vérifier la validité d'un nom proposé, soit pour rectifier une classification générique.



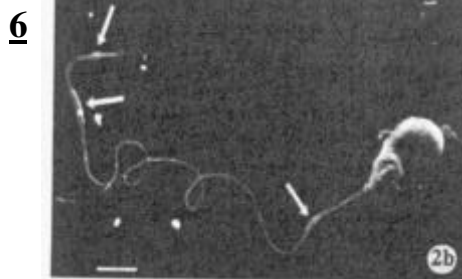
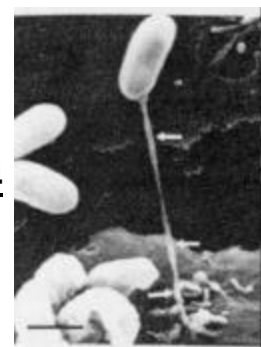
1: Spore de *E.intestinalis* au microscope électronique à transmission (MET), (f.p.=sections du filament polaire, v.a.=vacuole antérieure, v.p.=vacuole postérieure, N+sp=noyau et sporoplasme)
2: Spore de *E.bienewisi* au MET. Contrairement à celui de *E. intestinalis*, le filament polaire est enroulé en double (flèches). Chaque barre représente 1 μ m.
 (d'après Weber et al [75], dessin d'après Euzéby [23])



Clichés de microsporidies en
 microscopie électronique (MET) et en
 trois dimensions (SEM)

3: Tissu duodéal montrant une inclusion de spores et sporontes de *E. intestinalis* à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dans un entérocyte.
 La flèche montre la septation de la vacuole. La barre représente 1 μ m.
 (D'après Weber et al [75])

4: Spore de *E. intestinalis* dont le filament est déroulé.
5: Spores de *E. bienewisi* montrant la structure en forme de collier à la base du filament dévaginé.
6: Spore de *E. hellem* après dévagination du filament. Les flèches indiquent le passage du matériel infectieux. La barre représente 1 μ m.
 (d'après Schottelius et al [59])



1.4. Cycle

1.4.1. Caractères biologiques

Les *Microspora* sont toujours parasites et intracellulaires : les cellules hôtes sont des cellules épithéliales, musculaires, nerveuses, cellules du système des phagocytes mononucléés. Ils sont situés directement dans le cytoplasme et non au sein d'un phagosome, ainsi ils ne peuvent pas être attaqués par les lysosomes cellulaires.

1.4.2. Phases du cycle

Présentation [23]

La durée d'évolution est toujours brève, elle dure de 24 à 48h.

Les modalités évolutives sont liées à plusieurs facteurs extrinsèques:

- la température ambiante influe sur le nombre de spores obtenus,
- le stade de développement de l'hôte également: par exemple, il se forme 1 spore chez la larve de moustique, contre 8 spores chez l'imago, dans le genre *Parathelohania*.
- le sexe de l'hôte: chez les moustiques femelles, le parasite peut ne pas sporuler.
- les tissus de l'hôte: il est parfois nécessaire qu'ils soient différents selon le stade du parasite. Chez les insectes, les hémocytes abritent la mérogonie, alors que la sporogonie se déroule dans les cellules adipeuses.

Les cellules parasitées sont parfois très hypertrophiées et forment des masses pseudotumorales (ou xénôme) constituées d'une seule cellule (chez *Glugea* spp) ou d'un complexe syncytial (chez *Pleistophora* spp). Mais si ce xénôme protège les formes parasitaires au début, elles peuvent être attaquées par l'organisme par la suite.

Le cycle peut être décrit en trois phases : phase invasive (infectieuse), phase proliférative (ou mérogonie) et sporogonie [59].

1. Première phase: phase infectieuse

Elle se déroule en trois étapes: dévagination du tube polaire, entrée en contact avec la membrane de la cellule, enfin, pénétration dans la cellule.

Pour visualiser ces étapes, plusieurs méthodes sont requises, chacune donnant des informations fondamentales sur leur déroulement: les microscopie optique et électronique classiques permettent de se renseigner sur les aspects cinétique et moléculaires, alors que la microscopie électronique en trois dimensions (SEM, ou scanning electron microscopy) complète les aspects moléculaire et morphologique.

Observation au microscope optique [26]

Afin d'étudier l'entrée de ces microsporidies dans les cellules hôtes, on a utilisé le modèle expérimental de la lignée cellulaire Caco-2, cellules de carcinome du colon humain (Cf. 1.5.1.) Le temps de génération de *E. intestinalis* à l'intérieur de ces cellules est estimé à environ 24 heures.

On observe l'extrusion des tubes polaires au contact des membranes cellulaires après 5 minutes d'incubation avec les parasites.

Après 60 minutes, la majorité des microsporidies se trouvent à l'intérieur du cytoplasme. Durant ces premières étapes, la morphologie des cellules Caco-2 est préservée.

Observation au microscope électronique [26]

La petite taille des pathogènes (1 à 3 microns) fait qu'on utilise préférentiellement la MET, ou microscopie électronique par transmission. Cette technique a permis d'identifier les trois phases de développement et de donner des renseignements sur la morphologie, en deux dimensions, du parasite.

Durant les 30 premières minutes, on a trois étapes: un temps de latence, un temps d'adhésion des microsporidies aux cellules Caco-2, enfin une étape où les parasites semblent "englouties" dans des extensions cellulaires, après qu'on ait pu observer ou non l'extrusion du filament polaire.

L'adhésion (14% des microsporidies à 5 min; 25% à 15 min, 46% à 30 min) entre les microsporidies et les cellules, a lieu au pôle postérieur des spores (le pôle contenant la vacuole postérieure) dans 68% des cas et à la face latérale dans 32% des cas, mais n'est jamais observée au pôle antérieur de la spore (région du disque d'ancrage).

Cette adhésion est visible par une déformation de l'enveloppe externe de la spore. Les observations suggèrent la formation de ponts entre la membrane externe de la spore et la membrane cellulaire.

En ce qui concerne la cellule hôte, l'adhésion se fait préférentiellement au niveau d'une jonction inter-cellulaire (63% des cas). Après 15-30 minutes, 50% des microsporidies adhérentes sont à l'intérieur d'une invagination de la membrane cellulaire qui semble s'étendre à toute une protrusion de type pseudopode contenant des microfilaments. L'aspect ultrastructural des cellules inoculées a été préservé tout au long de ces observations.

Pour conclure, ces observations suggèreraient une interaction spécifique entre un ligand microsporidien et un récepteur cellulaire avant que l'extrusion du tube polaire ait eu lieu. Ainsi, l'interaction initiale pourrait lancer le processus d'extrusion du tube polaire.

Observation au SEM [59]

Or une équipe de Hambourg [59] a obtenu des images de la phase infectieuse grâce à la technique du SEM (scanning electron microscopy).

La grande profondeur de champ de cette technique permet de visualiser précisément, en trois dimensions, le parasite, son développement et l'interaction hôte-parasite. Mais, surtout, cette technique a permis de visualiser le fonctionnement du tubule polaire.

Le tube polaire déchargé peut être allongé ou enroulé de façon hélicoïdale. Une fois le tube polaire déchargé, la spore peut avoir un aspect complètement collabé ou défoncé.

L'infection commence avec l'évagination du filament et le contact de son extrémité avec la surface de la cellule hôte.

On observe fréquemment à cette extrémité une structure en forme de collier dont la signification fonctionnelle n'est pas claire. Il se pourrait qu'elle ait un rôle dans le mécanisme d'entrée du tube polaire dans la cellule hôte. Cette entrée se fait grâce à un processus d'invagination apparenté à une phagocytose. On peut observer grâce au SEM le début de la pénétration du filament dans la cellule hôte avec une réaction de la membrane formant un tunnel d'invagination.

Le filament utiliserait du matériel cellulaire pour s'allonger (cf. alinea "rôle de l'actine dans l'infection des cellules")

L'observation du filament montre ensuite des renflements qui indiquent le passage progressif du matériel infectieux de la spore vers la cellule hôte.

La phase infectieuse se termine donc par le transfert de la partie infectieuse de la spore, le sporoplasme, dans le cytoplasme, via le tube polaire.

Aspects moléculaires [26]

On étudie ces aspects grâce à l'infection expérimentale de cellules Caco-2 et à des techniques de fluorescence, par marquage de l'actine.

Rôle de l'actine F dans l'infection des cellules:

En augmentant la concentration cellulaire en cytochalasine D, on altère l'organisation cytosquelettique de l'actine F, et l'infection par *E. intestinalis* est alors réduite de façon significative. Ceci suggère que la cytochalasine réduit l'internalisation des microsporidies, et donc que l'actine est nécessaire à l'entrée du parasite dans la cellule.

Cinétique du phénomène

La microscopie confocale a confirmé que *E. intestinalis* se trouve au contact de l'actine dans les 30 minutes suivant le début de l'incubation du parasite avec les cellules Caco-2.

Après 15 minutes, les microsporidies se lient à l'actine F (fluorescence).

Après 30 minutes, 61% des microsporidies sont liées à l'actine F en périphérie des cellules Caco-2 et 39% sont dans le cytoplasme.

Controverses

La question reste posée quant à la nature des interactions éventuelles entre le parasite et la future cellule hôte, interactions qui entraîneraient l'extrusion du filament polaire, ainsi qu'au sujet des modalités exactes d'entrée du matériel infectieux dans la cellule.

2. Deuxième phase, mérogonie [59]

Elle est proliférative, ou appelée aussi mérogonie ou schizogonie, avec un développement intracellulaire qui ne peut pas être visible par SEM.

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, le sporoplasme se divise en formes prolifératives, ou mérontes. Ces formes ont une membrane simple, de petits ribosomes de type prokaryote et quelques organites.

3. Troisième phase: la sporogonie [59, 17]

Dans le genre *Encephalitozoon*, les parasites se répliquent par division binaire dans une vacuole parasitophore. On trouve les stades mérontes attachés ou étroitement alignés sur la membrane de la vacuole parasitophore.

En revanche, chez *E. bieneusi*, seule espèce du genre *Enterocytozoon*, les parasites se développent au contact direct du cytoplasme.

La sporogonie commence avec l'épaississement de la membrane plasmique et le développement des organites, comme le filament polaire et le réticulum endoplasmique. Les organites se développent en incluant des disques électron-denses qui s'entassent et se joignent pour former le filament polaire autour de chaque nucleus au sein du plasmodium sporogonial.

Les spores matures se séparent ensuite individuellement du plasmodium.

La division binaire se poursuit et les formes parasitaires deviennent de plus en plus électron-denses et se regroupent dans la région centrale de la vacuole parasitophore.

Une caractéristique du développement d' *Encephalitozoon intestinalis* est qu'une substance de matrice extracellulaire est sécrétée dans la vacuole parasitophore. Il semble que cette substance forme des septas au sein de la vacuole.

Les spores formées induisent un gonflement irrégulier à la surface de la cellule hôte, visible en SEM. En fin d'évolution, les membranes de la vacuole parasitophore et de la cellule hôte se rompent pour libérer les spores.

1.4.3. Particularités des microsporidies rencontrées chez l'homme [15]

Ces particularités permettent de les différencier lors du diagnostic.

1. Enterocytozoonidae: une seule espèce, *Enterocytozoon bieneusi*.

Sa localisation principale est l'épithélium de l'intestin grêle.

La mérogonie se déroule en une succession de divisions nucléaires sans séparation des cellules filles, qui forment des syncytia plurinucléés.

La sporogonie voit une fragmentation du syncytium, ce qui donne les spores uninucléées. Ceci se produit après la formation d'un tube polaire à proximité de chaque noyau syncytial.

2. Encephalitozoonidae: trois espèces: *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem* et *E. cuniculi*.

Ces microsporidies peuvent se disséminer dans tout l'organisme avec des cibles plus spécifiques telles que l'intestin, le rein, l'œil, le cerveau.

Tous les stades coexistent dans la même vacuole parasitophore [17, 16].

La mérogonie comporte plusieurs générations de mérontes uninucléés.

Lors de la sporogonie, les sporontes se divisent en sporoblastes, dont la maturation se fait en spores uninucléées.

3. Nosematidae: ce sont les genres *Nosema*, *Vittaforma*, *Brachiola*.

Tous les stades du développement sont diplocaryotiques.

-*Nosema ocularum* et *Vittaforma corneae* se localisent dans le stroma profond de la cornée [14]

-*Brachiola connori* provoque une microsporidiose disséminée.

-*Brachiola vesicularum* se trouve dans les cellules musculaires. Elle a une paroi épaisse à tous les stades.

4. Pleistophoridae: *Trachypleistophora* [25]

La mérogonie produit des mérontes à 2 ou 4 noyaux, entourés d'une épaisse paroi protéique qui délimite la vacuole sporophore dans laquelle s'effectue la sporogonie.

La sporogonie est la production par divisions binaires successives des sporontes, qui se divisent en sporoblastes, qui eux-même donnent les spores.

-*Trachypleistophora hominis* provoque la formation de xénômes dans les cellules musculaires. Sa sporogonie est simple.

-*Trachypleistophora anthropoptera*: infecte tout type de cellule (astrocytes, cellules de Schwann, cellules endothéliales, macrophages, myocytes cardiaques, adipocytes, hépatocytes, épithélium rénal et globulaire, moelle osseuse).

Sa sporogonie est double: il ya production de petites spores (infection des cellules et tissus voisins) et de spores plus grandes (qui seraient les agents de la transmission à d'autres individus)

1.5. Méthodes d'exploration des microsporidies

Les microsporidies sont des organismes très étudiés, à cause de leur implication en santé humaine et animale, mais aussi dans l'étude de phénomènes plus généraux comme l'immunologie.

Cet intérêt a fait qu'il existe à l'heure actuelle des modèles expérimentaux de référence, *in vitro* et *in vivo*.

1.5.1. Utilisation de lignées cellulaires [26]

Un modèle *in vitro* de l'infection de la lignée cellulaire Caco-2 (du carcinome humain du colon) a été développé pour rechercher la capacité de *E. intestinalis*, d'une part à entrer dans les cellules intestinales par phagocytose directe, et d'autre part à se répliquer dans le milieu intracellulaire.

Contrairement à des lignées originaires d'un épithélium intestinal normal, qui n'arrivent pas à exprimer des caractéristiques d'entérocytes matures, les cellules malignes Caco-2 possèdent, entre autres, une bordure en brosse typique exprimant des enzymes de l'intestin grêle.

Pour cette raison, cette lignée semble être adaptée aux recherches sur l'infection par les microsporidies, sachant que chez l'homme atteint du Sida, ce parasite est fréquemment retrouvé dans le cytoplasme des cellules épithéliales de l'intestin.

1.5.2. Utilisation de modèles animaux [60]

L'utilisation de modèles animaux permet l'étude des maladies chez l'animal; cette étude permet d'anticiper et de mieux comprendre les maladies chez l'homme. Les microsporidies en sont un bon exemple puisqu'elles sont étudiées depuis les années vingt chez l'animal, alors qu'on s'y intéresse chez l'homme surtout depuis une quinzaine d'années.

Dans le cas particulier de *Encephalitozoon cuniculi*, ce parasite avait au départ été reconnu comme agent de biais lors d'expérience sur les lapins de laboratoire

On utilise le modèle animal pour acquérir les bases des techniques de diagnostic, comprendre la pathogénie, les méthodes de propagation du parasite dans l'organisme et essayer des traitements.

Les modèles utilisés varient selon l'espèce microsporidienne étudiée.

1.5.3. Modèles utilisés selon l'espèce

1. *Enterocytozoon bieneusi*

Ce parasite, le plus fréquemment rencontré chez l'homme, n'a jamais pu être cultivé de manière continue sur culture de cellules et il n'y avait pas, jusqu'à récemment, de modèle animal.

Or l'occurrence spontanée d'une microsporidiose à *E. bienewi* chez des singes macaques (*Macaca mulatta*) infectés a été publiée en 1997 [67].

Une des caractéristiques de la maladie chez les singes est une hépatite très sévère, caractérisée par une fibrose portale, une hyperplasie intense et une inflammation du système biliaire. La maladie a été transmise expérimentalement à d'autres singes SIV positifs. Le parasite a été détecté dans les cellules infectées par observation de l'ultrastructure et par hybridation in situ.

On a également pu transmettre le parasite, isolé chez des singes infectés, à des porcelets immuno-supprimés gnotobiotiques [16, 67].

Les parasites sont trouvés dans les fèces de ces animaux un mois après l'administration orale. Certains des porcs développent de la diarrhée et les techniques de PCR et d'hybridation in situ permettent de trouver des parasites dans leurs selles et dans leurs tissus.

Ainsi, il semble y avoir deux modèles possibles: le singe macaque et le porc immuno-supprimé.

2. *Encephalitozoon intestinalis* se développe très bien en culture de cellules, mais il a été difficile de trouver un modèle animal.

Des souris athymiques avec des xénogreffes d'intestin fœtal de lapin ont été utilisées comme modèle animal [72]. Les auteurs ont placé deux segments d'intestin grêle, de fœtus de lapereaux proches du terme, sous la peau du dos de souris athymiques. Après cinq ou six semaines des parasites sont introduits dans le lumen de chaque xénogreffe.

Encephalitozoon intestinalis se réplique alors dans les entérocytes de l'intestin greffé et se dissémine également à travers la greffe et dans le foie [72].

Ce modèle expérimental peut être aussi utilisé avec les trois genres de l'espèce *Encephalitozoon*, et permet de reproduire de façon stérile les lésions et la répllication du parasite de manière quasi identiques à ce qu'on observe chez les patients infectés atteints du Sida.

3. *Encephalitozoon hellem*

La maladie peut être reproduite et modélisée chez la souris athymique infectée soit par inhalation, soit par injection intra-péritonéale. Les lésions sont étendues et sévères, avec des masses de parasites et de la nécrose dans les surrénales, le pancréas, le foie, les poumons, les sinus et les cavités nasales. La maladie est fatale pour ces animaux.

Dans le cas du modèle utilisant des xénogreffes intestinales, il est discutable de s'en servir pour l'étude d'*E. hellem* [72]. En effet, chez l'homme, le parasite n'est pas supposé toucher l'appareil digestif et la contamination par *E. hellem* se fait classiquement par voie respiratoire, ou bien par contact oculaire. De nouvelles recherches avec un nombre plus grand d'animaux sont nécessaires pour confirmer, ou infirmer, l'hypothèse d'un passage systémique à partir d'une porte d'entrée intestinale.

4. *Encephalitozoon cuniculi*

La maladie est facilement reproduite chez la souris immunodéprimée, et la plupart de ce que l'on connaît actuellement sur les microsporidioses chez les mammifères l'a été à partir de ce système expérimental. Ce système permet également une bonne modélisation de ce qui se produit chez l'homme infesté par *E. cuniculi*.

Comme chez l'homme, l'infestation se manifeste par une large dissémination des parasites, la nécrose des cellules hôtes, des infiltrats inflammatoires lymphocytiques et la présence de parasites, soit libres dans les tissus, soit dans des vacuoles parasitophores intracellulaires.

Dans le cas du modèle animal des xénogreffes intestinales sur le dos de souris, *Encephalitozoon cuniculi* se réplique alors dans les entérocytes de l'intestin greffé et se dissémine également à travers la greffe, ainsi que dans le cerveau, le tractus respiratoire, la rate, les glandes salivaires et le tractus gastro-intestinal des souris hôtes [72].

Ce modèle peut avantageusement remplacer le modèle classique. En effet, si les souris immunocompétentes ne montrent généralement pas de signes de la maladie, les souris artificiellement immunosupprimées (souris athymiques) peuvent trop rapidement développer l'infection et mourir [72].

La maladie a aussi été reproduite, dans les premiers temps, chez le lapin géant des Flandres [30] par inoculation des spores *per rectum*. On obtient alors de sévères lésions hépatiques, alors qu'une inoculation intraveineuse ou intra-trachéale les lésions entraîne plutôt des lésions des reins, du cerveau et du poumon.

La nature des lésions et leur sévérité semble donc dépendante de la voie d'inoculation des spores, et donc, chez l'homme, des modalités de contamination. (cf. 1.6.).

5. Autres microsporidies

Les souris athymiques peuvent être infestées par deux autres pathogènes humains, *Vittaforma corneae* et *Trachipleistophora hominis* [25].

V. corneae injecté par voie intra-péritonéale produit une maladie létale avec des masses parasitaires dans le pancréas, le foie, les surrénales, ainsi que les cellules péritonéales à la fois pariétales et viscérales. Les lésions de la cornée sont difficiles à reproduire.

T. hominis produit expérimentalement, chez la souris, des lésions du muscle, du foie et du cerveau, lésions quasi similaires à celles observées chez l'homme.

1.6. Epidémiologie

A. Données épidémiologiques

1. Chez l'homme

1.1. Chez les personnes immunodéprimées

1.1.1. Chez les malades du Sida

En 94, 10 cas de personnes non infectées par le VIH avaient été reportés, et plus de 400 cas chez des patients positifs au VIH. [74]

Fréquence:

Une étude menée au Mali a montré que 13.1% de 61 adultes HIV positifs sont porteurs de spores de microsporidies dans leurs selles [68].

En ce qui concerne les hôpitaux occidentaux, en 1993, une équipe de l'hôpital Saint-Louis, à Paris, trouve des microsporidies *E. bienewisi* chez 9 patients HIV positifs souffrant de diarrhée non expliquée sur 18 (50%) [48].

Les chiffres généralement admis sont les suivants [8]: 10 à 30% des diarrhées chez le patient atteint du SIDA sont liées à une microsporidiose, et 30 à 50% des hommes atteints du SIDA et infestés par *E. bienewisi* souffrent de diarrhée.

Cependant, dans le monde, la prévalence de microsporidiose parmi les personnes atteintes du Sida et de diarrhées chroniques se trouve entre 10 et 50%. La variabilité de cette prévalence est due à une variation géographique réelle, mais aussi à une variabilité du diagnostic et aux différents facteurs de risque pour l'exposition aux microsporidies [9].

Personnes concernées [9, 66]:

A notre connaissance, la grande majorité des cas publiés de patients HIV positifs atteints de microsporidiose concernent des hommes adultes, en majorité homosexuels. Cependant, un premier cas de microsporidiose chez une femme séropositive au VIH a été publié récemment, il s'agissait d'une microsporidiose touchant entre autres l'ovaire [66]. La maladie touche essentiellement des personnes souffrant d'immunodéficience sévère, avec des taux de lymphocytes CD4 < 100 cellules/mm³.

1.1.2. Chez les personnes âgées [46]:

Une étude menée en Espagne et publiée en 2002, sur 60 patients d'un service de gériatrie, montre que les personnes âgées négatives au VIH peuvent être atteintes de microsporidiose.

Sur 47 personnes hospitalisées pour diarrhée chronique, 8 étaient infectées par *E. bienewisi*.

Ceci peut être expliqué par le phénomène de l'immunosénescence, c'est-à-dire de diminution de l'efficacité du système immunitaire liée à l'âge.

Cette étude pose aussi la question de savoir s'il existe un portage sain chez l'individu immunocompétent qui expliquerait l'apparition de la maladie lorsque les défenses immunitaires s'affaiblissent, ou si la contamination se fait uniquement par l'environnement.

Les auteurs conseillent donc un dépistage systématique chez les personnes âgées souffrant de diarrhée chronique.

1.2.Chez les personnes immunocompétentes

1.2.1. Dans les pays en développement [2, 22]

Une étude a été menée en 1996 dans la population rurale agricole de deux villages d'altitude au centre du Mexique. 255 personnes de 70 foyers furent interviewés quant à leur source d'eau potable, leurs moyens sanitaires, les caractéristiques d'élevage, leurs animaux domestiques et des informations personnelles telles que l'âge, le sexe, les habitudes d'hygiène.

Les spores de l'espèce *Encephalitozoon* ont été recherchées dans leurs selles grâce à un test immunologique de routine mis au point par les auteurs (mAb 3B6)

7.84% des individus avaient des spores dans les selles et 21.4% des foyers étaient touchés.

Il n'y avait pas de différence significative selon l'âge, et, parmi les individus positifs, 72.2% sont des femmes et 27.8% sont des hommes.

Parmi les autres informations récoltées, seule la provenance de l'eau consommée semble avoir une influence. Les personnes utilisant de l'eau de source non traitée amenée aux habitations par des canalisations sont plus porteuses de spores dans leurs selles que celles utilisant de l'eau du puits.

De plus, seules deux des personnes interviewées présentaient des selles moulées, ce qui signifie, chez tous les autres, comme c'est souvent le cas dans les pays en voie de développement, la concomitance avec d'autres pathogènes intestinaux.

Cette enquête a donc montré que des spores d'*Encephalitozoon* sont présentes dans une proportion significative de personnes a priori non immunodéprimées, mais qui ont comme facteurs favorisants, des infections par des pathogènes intestinaux, des conditions d'hygiène déficientes et une eau contaminée.

1.2.2. Dans les pays développés [70].

En 1997 est parue une enquête menée sur le sérum de sujets immunocompétents, 300 donneurs de sang néerlandais et 276 femmes enceintes françaises, plus 150 sujets atteints de maladies infectieuses ou non infectieuses, afin de confirmer la spécificité.

La prévalence humaine des microsporidies est peu connue par manque de tests fiables. Cette enquête fut menée grâce à l'utilisation conjointe de trois tests sérologiques: le test ELISA, le Test IFAT (immunofluorescence technique) et de test CIE (counter immuno electrophoresis).

Les trois tests sont spécifiques de l'infection microsporidienne, mais seuls les tests IFAT et CIE sont spécifiques de l'espèce *Encephalitozoon*.

Les résultats de l'enquête ont montré que 8% des donneurs néerlandais sont porteurs d'antigènes, ainsi que 5% des françaises. Cela suggère que l'infection par *Encephalitozoon* est relativement courante chez les individus immunocompétents.

Cependant, le facteur sexe n'est pas déterminant, alors que la prévalence augmente avec l'âge, avec un maximum pour la tranche des 40-50 ans, et diminue à nouveau ensuite.

La distinction entre espèces du genre *Encephalitozoon* n'a pas été faite, mais, du point de vue pratique hospitalière, le traitement est dans tous les cas celui par l'albendazole.

Cependant les groupes à risques mériteraient d'être redéfinis plus précisément.

2. Chez l'animal

E. bienewisi a été trouvé chez le chien et le chat, [72]...

E. intestinalis a été trouvé chez l'âne, le chien, le porc, la vache et la chèvre [6].

E. cuniculi a été trouvé chez le lapin, le cobaye, la souris, le rat, le chien, le cheval, le renard arctique, le chat domestique, le léopard, le babouin et la chèvre angora [35, 6, 10]...

E. hellem a été trouvé chez des psittacidés domestiques ou sauvages commercialisés, l'autruche [4, 61, 64]

Différentes études épidémiologiques ont été menées sur des populations animales afin d'avoir une idée de la prévalence des microsporidies dans l'environnement de l'homme.

2.1. Chez le chien [35]

Une enquête sérologique sur 248 chiens montre que 13.3% de cette population canine est séropositive à *E. cuniculi*.

2.2. Chez le lapin

-16% des lapins autopsiés dans le cadre d'un laboratoire sont séropositifs à *Encephalitozoon cuniculi* [13].

-Sur 277 lapins de compagnie testés, 45.1% sont séropositifs à *E. cuniculi*, et plus de la moitié de ces lapins ayant développé des anticorps ne présentent aucun symptôme. D'où la question de savoir si le lapin est une espèce réservoir du parasite [24].

Sur 81 lapins sauvages, une équipe australienne a démontré que 20 (25%) étaient porteurs d'anticorps contre *E. cuniculi*. Sur 29 lapins de laboratoires soumis aux mêmes tests, 22 étaient séropositifs à cette microsporidie [65].

La même étude menée en France en 1990 sur des lapins de Garenne donnait le résultat de 3.9% de lapins séropositifs à *E. cuniculi*.

2.3. Chez les oiseaux [4]

Des élevages industriels mal conduits de psittacidés ont été touchés aux Etats-Unis et ont connus de fortes pertes.

De rares cas ont été rapportés chez l'oiseau de compagnie.

2.4. Chez les animaux de rente [12, 10]

Sur le plan anecdotique, *E. bienewisi* a été retrouvé chez des Ongulés exotiques du zoo de Munich.

Une étude sur 48 chèvres angora a révélé que 6 d'entre elles (12.5%) portaient des anti-corps contre *E. cuniculi.*, ce qui pose la question du risque encouru par les éleveurs et les personnes en contact avec ces animaux et devrait encourager les recherches dans d'autres populations de bétail.

3. La question du réservoir naturel

3.1.L'eau

La théorie d'une transmission par l'eau de consommation ainsi que les rapports tendant à la prouver sont cependant controversés, les études menées n'étant pas suffisamment sûres pour certains scientifiques [36].

3.2.Une espèce animale?

Selon K. Wasson *et al*, en 1999 [72],

"Jusqu'à présent, tous les génotypes identifiés chez des animaux infectés naturellement sont différents des génotypes de *E. bienewisi* identifiés chez des patients atteints du SIDA, ce qui indique que d'autres sources sont responsables de l'infection humaine.

En 1998, une équipe de l'Hôpital St-Louis, à Paris [37], a mis à jour trois facteurs de risques de la microsporidiose humaine, à *E. bienewisi* ou *E. intestinalis*, chez 30 de leurs patients: un taux de CD4+ inférieur à 200/mm³, l'homosexualité masculine et une baignade en piscine durant les douze précédents mois.

La contamination se ferait donc par voie sexuelle et par l'eau contaminée.

Ni le contact avec des animaux de compagnie, y compris chiens et chats, ni l'exposition à différents types de nourriture ou de consommation d'eau du robinet ne sont associés avec la maladie, si on conserve l'hypothèse selon laquelle la transmission se fait par voie fécale-orale."

Ces résultats concernent cependant seulement une population limitée d'hommes occidentaux hospitalisés dans un hôpital parisien.

B-Modes de contamination

1-Transmission horizontale

1.1-Chez l'homme [9, 33]

L'entrée des microsporidies semble se faire, d'après les symptômes, par inhalation ou contact oculaire (*E. hellem*), par voie orale ou rectale (*E. bienewisi* et *Encephalitozoon* spp.).

1.2-Chez les animaux [60]

La transmission horizontale se produit probablement aussi via l'urine infestée, au moins dans le cas des lapins et des chiens. Expérimentalement, ce moyen de transmission a été difficile à démontrer chez la souris.

Dans le cas des oiseaux [4], les microsporidioses se produisent en élevage insalubre, mal nettoyé. La transmission se fait probablement par les fientes, des spores étant retrouvées dans l'intestin et les reins [53].

De plus, la charge infectieuse environnementale est augmentée lors de surpopulation, et le stress de déplacement peut également favoriser l'épizootie.

Cas du lapin [29]:

Un torticolis en élevage de lapins nains est plus fréquemment causé par *E. cuniculi*, alors qu'en élevage standard c'est plutôt *Pasteurella multocida*.

La transmission se fait par ingestion ou inoculation orale de spores infectieuses libérées dans l'urine. Il se peut qu'existe une transmission transplacentaire.

La transmission se fait par voie urino-orale, de la mère au jeune. Les spores sont absorbées dans l'intestin dans les cellules mononuclées puis distribuées vers les organes, avec une prédilection pour le rein et le tissu cérébral où des lésions sont le plus fréquentes.

Les spores peuvent survivre plus d'un mois dans l'environnement.

2-Transmission verticale

On soupçonne son existence chez les animaux: ainsi les petits d'une chienne infectée ont présenté la maladie.

C.Etiologie générale des Microsporidioses [23]

Les spores formées chez un individu parasité sont mûres dès leur libération et sont évacuées soit par les voies naturelles (infection des organes creux), soit par décomposition des cadavres. Elles sont dispersées par des prédateurs ou des vecteurs inertes : poussières, fèces pulvérisés.

Les spores sont très résistantes grâce à la couche chitineuse de l'endospore et ont une grande durée de survie dans le milieu extérieur : 3-4 mois en milieu sec à la température ordinaire, jusqu'à 7 mois en milieu humide et froid. En revanche, elles supportent mal le soleil, qui les tue en quelques jours ; elles sont aussi très sensibles aux fermentations et à la putréfaction.

L'infection est contractée :

- par voie buccale, ingestion de substrats souillés de spores, carnivorisme, cannibalisme.
- par voie tégumentaire, en cas de solution de continuité du tégument
- par voie transovariale : cf. Nosémose du vers à soie (Pébrine).
- par voie transplacentaire : cf. Encéphalitozoonose chez le lapin.

Après leur pénétration dans l'organisme, les spores sont transportées par voie sanguine dans le lieu de leur habitat sélectif, sauf si, absorbées par voie orale, leur localisation est le tube digestif.

1.7. Potentiel zoonotique des microsporidies

On suspecte toutes les microsporidies communes à l'homme et à l'animal d'être des agents zoonotiques. Cependant, on ne possède, à l'heure actuelle, qu'un faisceau convergent de suspicions.

1.7.1. *Encephalitozoon cuniculi* [13, 62]

Les animaux suspectés sont les lapins, les chiens, les chats et d'autres animaux domestiques.

En 1996, pour rechercher le potentiel zoonotique des microsporidies de type *Encephalitozoon* on a isolé et cultivé des spores issues de prélèvements de patients infectés par le VIH et de lapins [13].

Ces spores furent identifiées comme *Encephalitozoon intestinalis* chez un des patients, comme *E. hellem* chez deux patients symptomatiques, et comme *E. cuniculi* chez tous les lapins et chez trois patients, dont un seul était symptomatique (pneumonie interstitielle sévère, spores dans l'urine et lavage broncho-alvéolaire).

Le fait que le même parasite soit retrouvé chez l'homme et chez le lapin suggéra qu'il pouvait exister un lien zoonotique.

Aucune étude épidémiologique n'a confirmé une transmission du chien à l'homme. Cependant, on a reporté un portage à long terme de spores par des chiens asymptomatiques, ce qui soutient la thèse de la transmission zoonotique.

Une étude sérologique sur 248 chiens [35] a montré que 13.3% de cette population canine est séropositive.

On est actuellement en mesure de distinguer trois souches de *E. cuniculi* chez les animaux et chez l'homme [62]. On a différencié plusieurs souches dont le marqueur génétique est le nombre de copies du tétranucléotide 5'-GTTT-3' dans la région ITS de l'ADN ribosomique: 2 (souche I), 3 (souche II) ou 5 (souche III).

Ainsi, on s'est aperçu que les parasites trouvés chez les lapins, souris et renards appartenaient aux souches I ou II, alors que chez les chiens, on trouve la souche III. [62]

Chez l'homme on observe la souche I en Europe et la souche III dans l'hémisphère occidental.

Bien que les sources d'exposition humaine soient inconnues, il semble de plus en plus flagrant que les animaux pourraient servir de réservoir. Etant donné que les spores résistent plusieurs mois dans l'environnement et sont excrétées dans l'urine et les selles des chiens domestiques atteints [62], l'homme pourrait se contaminer de manière directe ou indirecte par l'environnement souillé par les excréments canins. Aucune relation entre la possession d'un chien et la contamination humaine n'a encore été étudiée.

E. cuniculi est cependant considéré comme un parasite zoonotique [13].

1.7.2. *Enterocytozoon bieneusi* [12]

Les animaux suspectés sont également les mammifères domestiques.

Les réservoirs et les modes de transmission de la plus fréquente des microsporidies rencontrées chez l'homme, *Enterocytozoon bieneusi*, sont toujours inconnues.

Cependant, afin de rechercher un caractère zoonotique de ce parasite, une équipe allemande a examiné les selles de 26 hommes et de 350 animaux de 37 espèces. Ils ont trouvé 18 échantillons positifs chez l'homme, le chat, le porc, le bétail et un lama.

Les microsporidies décelées sont des *Enterocytozoon bieneusi*. Il existe entre les différents échantillons une variabilité génétique qui se fait au niveau d'un fragment de 243 paires de bases de la séquence ITS (internal transcribed spacer) de l'ADN ribosomique.

Cette caractérisation génotypique donne 14 différents génotypes plus 6 nouvellement décrits. Ils sont désignés par les lettres de A à Q, et Ebfel A, EbpD et EbpB.

Les analyses phylogéniques révèlent une absence de barrière de transmission entre les *E. bieneusi* de l'homme et ceux des chats, porcs et bétail.

Cette présence simultanée d'un parasite chez l'homme et l'animal porte donc à croire au caractère zoonotique de *E. bieneusi*, mais sans qu'on connaisse à l'heure actuelle les éventuelles modalités de transmission.

1.7.3. *Encephalitozoon hellem* [64]

La suspicion porte sur les oiseaux.

Des séquences identiques d'ITS ont été retrouvées chez un perroquet sauvage importé d'Indonésie et chez l'homme, ce qui indiquerait que les oiseaux pourraient être des sources d'infection pour l'homme. Différentes publications ont pour sujet l'identification des différents génotypes de *E. hellem*, dont [64].

Ainsi, il existe chez *E. hellem* une variabilité génétique comparable à celle de *E. cuniculi*, et, comme chez ce dernier, il n'y a pas de lien entre le génotype ITS et le profil antigénique.

En ce qui concerne *E. cuniculi*, la classification génotypique a une signification biologique, car chaque génotype a une préférence d'hôte, voire même une préférence géographique. Ces caractéristiques n'ont pas encore pu être suspectées dans le cas d'*E. hellem* car trop peu d'isolats ont pu être étudiés.

Cependant on peut observer que le génotype 1 est présent en Amérique (patient séropositif au VIH) et en Asie (perroquet), alors que les génotypes 2 et 3 sont présents en Afrique et en Europe, les oiseaux étant éventuellement les hôtes réservoirs.

L'homme se contaminerait en inhalant des particules de selles envoyées dans l'air par les battements d'ailes ou mouvements de plumes des oiseaux, ou par contact oculaire.

1.7.4. Autres microsporidies

Dans le cas des myosites dues à *Pleistophora* spp., on a suspecté une transmission par le poisson, sans que cela ait pu être encore prouvé.

1.7.5. Notes sur la notion de spécificité d'hôte [15]

Selon Mme Isabelle Desportes-Livages (La Pitié-Salpêtrière, unité INSERM 511):

"Les microsporidies de Mammifères semblent être ubiquistes à l'intérieur de la classe comme le suggère la diversité des hôtes asymptomatiques (rongeurs, carnivores, lagomorphes, ruminants, primates). La notion de "spécificité" se retrouve au niveau du génotype qui varie avec l'hôte. Cependant l'immunodéficience favorise le passage de souches, trouvées chez l'homme, à l'animal et réciproquement.

Les cas d'infection rares, voire exceptionnels chez l'homme seraient causés par des espèces présentes chez des hôtes phylétiquement plus éloignés (oiseaux, poissons (?)) ou très éloignés (diptères) dont le passage à l'homme ne s'effectue que dans un contexte d'immunodéficience."

1.8. Immunologie: interaction hôte-parasite [40, 17, 60]

1.8.1. Interactions hôte-parasite [40, 60, 46]

Les effets pathologiques des microsporidies se divisent en deux grands groupes.

1. Forme aiguë

La première forme est une maladie aiguë, clinique, qui conduit fréquemment à la mort. Ceci est le plus fréquent chez les animaux nouveaux-nés, en particulier les chiens, renards et singes écureuils et chez les adultes immunodéprimés. Certains nouveaux-nés (chiens et renard) peuvent se remettre de l'infestation mais en développant ultérieurement des maladies auto-immunes ou des complexes immuns.

2. Forme chronique

La deuxième forme pathologique est la forme chronique, avec éventuellement quelques symptômes de façon transitoire, puis un silence clinique avec, toutefois, une persistance de l'infection.

C'est la forme touchant généralement les adultes, la résistance de l'hôte semblant liée principalement à des mécanismes de défense immunitaire. Ainsi, les souris immunocompétentes infectées par *E. cuniculi* sont peu susceptibles de développer la maladie. Il semblerait également que certaines souches de souris ont une plus grande résistance, au vu de la variabilité du pourcentage de macrophages contenant des parasites à la suite d'une infection intra-péritonéale. Cela signifierait qu'il existe un composante génétique à la capacité de résistance de l'organisme.

3. Passage éventuel d'une forme à l'autre

Cependant, la forme chronique pourrait devenir aiguë avec le vieillissement. En effet, le fait de vieillir implique une diminution des capacités immunitaires, en particulier de la réponse cellulaire, phénomène appelé "immunosénescence". Ceci est lié d'une part à l'involution du thymus due à l'âge: la différenciation et la maturation des lymphocytes T s'en trouve altérée, et d'autre part bien sûr à la plus grande sensibilité des personnes âgées [46].

La forme chronique pourrait, de la même façon, devenir aiguë chez des personnes subitement immunodéprimées, lors du traitement accompagnant une greffe, ou lors de maladie tropicale du voyageur [45].

Les interactions entre les microsporidies et l'organisme parasité ont été étudiées dans les cas de la souris et de *E. cuniculi*. L'hôte semble se défendre via une réponse immunitaire de type cellulaire, en particulier cytotoxique, plus qu'en utilisant des anticorps.

1.8.2. Rôle de l'immunité à médiation cellulaire [40, 17].

La réponse immunitaire à médiation cellulaire semble être la plus importante dans la lutte contre la maladie causée par les microsporidies [17]. En effet, les souris dont ce type d'immunité est expérimentalement supprimé (souris athymiques ou CD8+ T-cell knockout) meurent des suites de l'infection, et les personnes déficientes en lymphocytes T (atteintes du Sida, suivant un traitement anti-rejet) sont plus susceptibles de déclarer une microsporidiose.

Des souris athymiques meurent lorsqu'elles sont infestées, mais le transfert de cellules T sensibilisées spécifiquement, ou de cellules de rate enrichies en cellules T sensibilisées, a une action protectrice.

Par ailleurs, les macrophages vont tuer les parasites s'ils sont, au préalable, sensibilisés grâce au surnageant d'une culture de cellules T spécifiquement sensibilisées.

Enfin, les cellules T ont une action protectrice en relâchant des interférons gamma ainsi que peut-être d'autres cytokines.

Les deux types de cellules T, CD4+ et CD8+ semblent importantes dans la défense de l'organisme, mais les souris privées de CD8+ semblent encore plus fragilisées que celles privées de CD4+. Chez l'homme, c'est la baisse des CD4+, dans le cas du Sida, qui favorise le développement d'une microsporidiose.

1. Rôle des cytokines:

Les cytokines utilisées dans la réponse cellulaire Th1, comme l'interféron gamma (IFN- γ) et Il-12, semblent avoir un rôle prépondérant dans la lutte de l'organisme contre les microsporidies.

In vitro, des macrophages ont pu être activés et détruire ces parasites après avoir été incubés avec des IFN- γ . In vitro et in vivo, on assiste à une augmentation du taux d'IFN- γ au cours de l'infection. Enfin, la neutralisation des IFN- γ et Il-12 chez la souris (par des anticorps anti-IFN- γ ou des récepteurs spécifiques neutralisants) la rend plus susceptible de développer une microsporidiose et augmente la mortalité.

En revanche, la production de cytokines de la réponse cellulaire de type Th2 (par exemple Il-4 et Il-10) est minimale. On n'a pas trouvé de Il-4 dans le sérum de souris infectées, mais une augmentation des Il-10 est observée dans les cellules spléniques. Or, Il-10 aurait un rôle dans la régulation de la réponse Th1, ce qui expliquerait sa production.

2. Réponse des cellules T cytotoxiques contre l'infection par *E. cuniculi*

Les lymphocytes CD8+ semblent jouer le rôle le plus important dans la défense de l'organisme contre les microsporidies. Leur effet protecteur serait lié à leur production de cytokines et à leur action directe de destruction de cellules infectées dans les tissus de l'hôte. L'agent de destruction utilisé est la perforine: des souris privées du gène codant pour la perforine succombent à une infection microsporidienne, ce qui prouve l'importance de l'action de défense cytotoxique.

Cette action cytotoxique est même dirigée contre les propres agents de défense de l'organisme, puisque les macrophages infectés sont lysés.

Rôle des T CD4+

Dans la majorité des cas, les cellules CD8+ sont activées par les lymphocytes CD4+ produisant des cytokines Il-2. Cependant, on a vu que dans le cas des microsporidiose, des souris ne disposant que de cellules CD8+ se défendent très bien contre l'infection. L'infection par *E. cuniculi* offre donc un exemple d'induction des lymphocytes CD8+ en l'absence de lymphocytes CD4+.

Rôle des cellules T $\gamma\delta$

Ces cellules sembleraient être impliqués dans la mise en route primaire de la réponse immunitaire, car l'augmentation du nombre de ces cellules produisant des IFN- γ est directement suivie d'une augmentation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ producteurs d'IFN- γ .

Le nombre de ces lymphocytes augmentent quelques jours après l'infection par *E. cuniculi*, mais les souris n'en disposant peuvent quand même survivre à l'infection.

Selon ces observations, il semblerait que les lymphocytes T $\gamma\delta$ activeraient les lymphocytes T CD8+ grâce à leur production précoce de l' IFN- γ nécessaire.

1.8.3. Rôle de l'immunité à médiation humorale [40, 17]

Des IgM, puis des IgG contre les microsporidies sont générées chez les individus immunocompétents et persistent tout au long de la vie de l'hôte.

Chez les individus immunodéprimés, la réponse en anticorps au cours de l'infection est variable. Cependant, le transfert de lymphocytes B activés ou de sérum hyper-immun à des souris athymiques ne suffit pas à les protéger de la mort suite à une infestation par *E. cuniculi*.

Quoiqu'il en soit, lors de l'infection par *E. cuniculi*, il peut se produire un grand nombre d'anticorps contre de nombreux antigènes de cet organisme et nombreux de ces anticorps font des réactions croisées avec d'autres microsporidies.

Bien que le transfert de sérum hyper-immun ne protège pas les souris athymiques d'une microsporidiose létale par *E. cuniculi*, les anticorps semblent cependant avoir un rôle protecteur restreint en opsonisant les microsporidies, ce qui facilite leur prise en charge par les macrophages, et en les neutralisant avant qu'elles n'infectent une nouvelle cellule hôte.

De plus, la fixation du complément, induite par les anticorps spécifiques, pourrait causer la lyse des formes immatures du parasite, qui n'ont pas encore d'enveloppe chitineuse épaisse.

Enfin, il semblerait que les IgG traversent le placenta et confèrent une immunité passive aux lapereaux pendant pendant au moins deux semaines, voire jusqu'à 6 à 7 semaines [23].

En conclusion, la réponse de l'hôte à l'infection par *E. cuniculi* serait essentiellement de type cellulaire cytotoxique, grâce à une production précoce d'IFN- γ par les lymphocytes T $\gamma\delta$. La réponse à médiation immune, peu efficace, semble trouver son intérêt majeur dans son application diagnostique.

III. 1:

Evolution de l'infection expérimentale par *E. intestinalis* chez des souris sans récepteur à l'interféron gamma[21]

Deux groupes de souris sont expérimentalement infectées par *E. intestinalis*: un groupe de souris avec une déficience du gène codant pour les récepteurs à interféron gamma, un groupe de souris de type sauvage. Cette inoculation résulte en une infection chronique chez les souris sans récepteur, avec une excrétion permanente de spores dans les matières fécales, leur nombre augmentant progressivement pendant la période d'étude (60 jours).

On observe également une infection chez les souris de type sauvage, mais le nombre de spores excrétées diminue rapidement pour n'être plus détectable 15 jours après inoculation.

Aucun des deux groupes ne développe de symptômes, mais une splénomégalie, un élargissement des canaux biliaires et l'apparition de nombreux nodules dans le foie et l'intestin grêle sont observés à quatre semaines uniquement chez les souris sans récepteur pour l'interféron gamma.

On a suivi l'évolution des titres d'anticorps IgA, IgM et IgG grâce à des tests ELISA réguliers.

Les IgA restent faibles durant toute la durée de l'étude chez les deux groupes.

Les IgM augmentent lentement des jours 15 à 30, puis diminuent de même après le jour 30 chez les souris sans récepteur. Chez les souris sauvages, les IgM restent basses.

Enfin, les IgG réagissent très différemment entre les deux groupes. Alors que leur taux reste faible chez les souris sauvages, il augmente constamment et de manière importante chez les souris modifiées. De plus la production de IgG1 est plus forte que celle de IgG2.

En l'absence de récepteurs à interféron gamma, les cellules B sécrétant des anticorps continuent d'être activées par les cytokines Th2. Ainsi, les souris sans récepteur génèrent des cytokines Th2 IL-4 et IL-10. En l'absence de son récepteur, l'interféron gamma n'inhibe pas la production de IL-4 et IL-10 et on observe, chez les souris mutantes, l'instauration d'un profil Th2 alors qu'il est Th1 chez les souris sauvages.

La réponse humorale est ainsi plus importante chez les souris sans récepteur qui développent une infection chronique que chez les souris sauvages infectées.

Il semblerait cependant que les souris privées de récepteurs à interférons gamma seraient tout de même plus résistantes à l'infection que les souris athymiques.

2. Microsporidioses de l'homme et de l'animal

2.1. Microsporidioses humaines

Les microsporidies les plus courantes retrouvées chez des personnes positives au VIH sont *Enterocytozoon bienewisi* et, moins fréquemment, *Encephalitozoon intestinalis*. Les malades sont le plus fréquemment des personnes souffrant d'immunodéficience sévère, avec des taux de lymphocytes Tcd4 inférieurs à 100 par μ L.

Ces patients ont également des taux significativement plus bas en score de Karnofsky et en absorption du D-xylose [48].

Fréquence des différentes atteintes:

Une enquête rétrospective en 1995 [33] a permis de classer les sites les plus souvent touchés lors d'infection par les microsporidies. Dans l'ordre décroissant, ce sont l'intestin grêle, le tractus urinaire, le tractus biliaire, les yeux, le colon et le système nerveux central.

Tableau de pathogénicité [8]

	E. bienewisi	E. intestinalis	E. cuniculi	E. hellem
Troubles intestinaux	+	+	+	
Troubles biliaires	+	+		
Troubles pulmonaires	+	+		+
Troubles sphère ORL	+			
Troubles urinaires		+	+	+
Troubles oculaires		+	+	+
Troubles neurologiques			+	
Dissémination		+	+	+

Voici les principaux symptômes observés:

2.1.1. Infections du tractus gastro-intestinal [27]

Les symptômes sont une diarrhée sévère, non sanguinolente, non mucoïde, avec un minimum de 10 spasmes par jour, une perte de poids progressive, une malabsorption des lipides, du D-xylose et de la vitamine B 12.

L'infection intestinale est liée à une déficience en lactase.

L'activité de la phosphatase alcaline et de l'alpha-glucosidase est réduite à la partie basale du villus avec réduction des villosités en hauteur et en surface.

Infection gastro-intestinale asymptomatique [28]:

Ce patient n'a jamais eu de diarrhée bien que suivi depuis 4 ans, mais on a mis en évidence des spores de microsporidies dans le mucus nasal, sur un écouvillon conjonctival, dans le sputum, l'urine et les selles, et surtout dans les biopsies duodénales.

2.1.2. Infection du tractus biliaire[27, 33]

Il s'agit d'infections par *E. bienewisi*. Les patients souffrant de cholangiopathie ont des douleurs abdominales et des diarrhées chroniques ou de la cholestase, ainsi qu'une perte de poids.

Des spores sont retrouvées dans la bile, dans les biopsies duodénales, voire dans l'épithélium de la vésicule biliaire.

Les concentrations sériques en phosphatases alcalines et en gamma-glutamyltransférase sont au moins 1.5 fois plus élevées que la normale chez la plupart des patients.

2.1.3. Hépatite et péritonite [43]

On observe une hépatite granulomateuse et l'autopsie révèle une péritonite sévère avec présence d'une large masse granulomateuse contenant des formes microsporidiennes en développement.

2.1.4. Infections oculaires [27, 39]

E. hellem et *E. cuniculi* peuvent causer une kérato-conjonctivite.

On observe le plus souvent une inflammation conjonctivale bilatérale, ainsi qu'une kératopathie bilatérale épithéliale ponctuée menant à une diminution de l'acuité visuelle. Il existe une sensation de corps étranger, une sensibilité à la lumière et une rougeur oculaire [39].

2.1.5. Sinusite [33]

Les symptômes sont une inflammation et des écoulements muqueux; on peut trouver des polypes multiples dans la cavité nasale et les sinus. On retrouve des spores d'*Encephalitozoon* spp dans les écouvillons nasaux et les prélèvements de polypes.

2.1.6. Infection pulmonaire [7, 11]

Des troubles respiratoires qui s'ajoutent à des troubles digestifs et une altération de l'état général peuvent faire penser à une infection microsporidienne du tractus respiratoire.

Le diagnostic se fait par lavage broncho-alvéolaire.

Les patients peuvent présenter des troubles respiratoires importants, dont une toux productive et une infiltration alvéolo-interstitielle diffuse bilatérale.

Cependant, la détection de *E. bienewisi* peut aussi correspondre à une simple colonisation asymptomatique du tractus respiratoire, plutôt qu'à une véritable infection.

L'atteinte pulmonaire se fait par inhalation, régurgitation, contamination oro-fécale directe ou par dissémination hématogène à partir du tube digestif, peut-être suite à une sinusite chronique.

Le fait de trouver des spores pourrait résulter d'une simple colonisation associée à une infection intestinale. [7]

L'infection peut également être asymptomatique et temporaire. On peut avoir une affection respiratoire liée à une autre agent (par exemple pneumonie à *Pneumocystis carinii* ou tuberculose), dont la présence est liée à l'état d'immuno-dépression du malade [58].

2.1.7. Infection du tractus urinaire [13]

On a relevé la présence de *E. hellem* chez des patients séropositifs au VIH et atteints d'infection aiguë du tractus urinaire ou de cystite diagnostiquée.

2.1.8. Myosite [27]

Trachipleistophora hominis [25] provoque des douleurs musculaires progressives et persistantes, lancinantes, des myalgies invalidantes, une faiblesse des membres supérieurs, de la fièvre à 39°C, une perte de poids malgré une alimentation correcte per os.

Dans le cas rapporté, d'autres symptômes peuvent être associés: diplopie, léthargie, odynophagie, toux productive, antécédents de méningite à streptocoques, CK augmentés, kératoconjonctivite bilatérale.

Les biopsies du muscle deltoïde montrent des structures évoquant une leishmaniose ou des sarcocystes. Ces spores sont plus grandes que les spores microsporidiennes usuelles: 4 microns de long. Le diagnostic est confirmé par ME.

2.1.9. Infection cérébrale [14, 33]

Les symptômes sont de la fièvre, des maux de tête et des crises nerveuses.

2.1.10. Manifestations rares

a-Urétrite [32]

Comme les symptômes de sinusite, ceux de l'urétrite (dysurie, pyurie stérile, douleur) peuvent survenir chez des patients ayant un historique de diarrhées microsporidiennes, et ceci plusieurs

mois après disparition des troubles digestifs, mais avec persistance de la présence de spores (*E. intestinalis*) dans les fèces. On suppose donc qu'il existe une infection latente. Le diagnostic différentiel comporte la gonorrhée et l'infection par des chlamydia. Les symptômes sont éradiqués rapidement par un traitement à l'albendazole.

Les patients excrètent aussi fréquemment des spores dans l'urine sans qu'il y ait de symptômes [33].

b-Microsporidiose cutanée[27]

Un cas de microsporidiose nodulaire cutanée a été observé chez un patient positif au VIH et a été traité par de la clindamycine orale. Une ostéomyélite sous-jacente, également résolue par le traitement, le rôle des microsporidies n'a pas été prouvé. (La différenciation spécifique par PCR a été sans succès

c-Atteinte des ovaires [66]

Le premier cas décrivant une atteinte des ovaires a été décrit récemment chez une femme décédée des suites d'un SIDA. Elle souffrait d'une microsporidiose disséminée et des spores ont été retrouvées dans le foie, les reins, les corticosurrénales, les ovaires, le cerveau, le cœur, la rate; les poumons et les nœuds lymphatiques. La MET et l'immunofluorescence ont permis de classer le parasite dans le genre *Encephalitozoon*, et les analyses moléculaires l'ont déterminé comme *E. cuniculi*, de génotype III.

Ce type de cas est rare dans la littérature, les cas cliniques étudiant le plus souvent des patients de sexe masculin.

d-Autres:

On peut également observer des abcès prostatique, des ulcères de la langue, voire une implication squelettique

2.1.11. Infections disséminées [14, 33, 43]

Une infection disséminée peut faire suite à une première infection localisée

Les symptômes observés dans le cas d'une infection disséminée sont fatigue, fièvre, douleur abdominale, ainsi que dysurie, sinusite chronique, douleur oculaire superficielle [43] et tout symptômes d'infection localisée.

Il devient difficile de savoir si tous les symptômes sont liés à une ou plusieurs infections microsporidiennes [33].

Les mécanismes de dissémination des microsporidies ne sont pas connues. Il semble que l'infection soit d'abord locale, puis qu'il y ait une dissémination par voie sanguine [33].

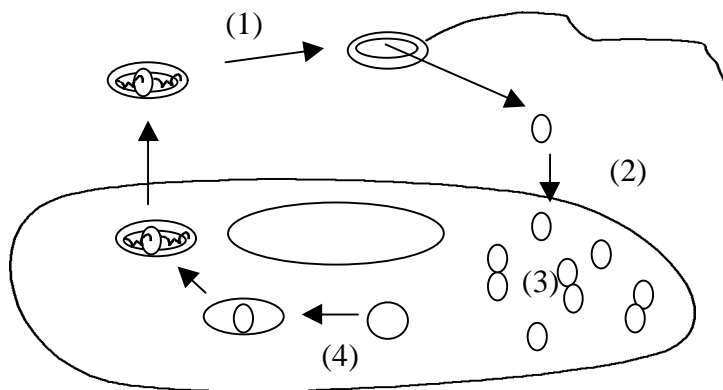
2.2. Microsporidiose chez les animaux

2.2.1. Chez les Insectes [55, 23]

Les microsporidies ont une importance économique non négligeable, car ils parasitent des insectes utiles. Ainsi *Nosema bombycis* infecte les vers à soie, provoquant la pébrine, et *Nosema apis* provoque une dysenterie grave chez les abeilles.

Cependant, il lui a été trouvé une utilité potentielle en tant qu'agent de contrôle biologique de certains insectes. Par exemple, l'"Environmental Protection Agency", aux Etats-Unis a approuvé et enregistré *Nosema locustae* dans les contrôle résiduel des sauterelles.

Cycle de *Nosema bombycis* [55]



La spore dévagine son filament (1) et le matériel infectieux pénètre dans une cellule épithéliale de l'intestin du ver à soie (2). Des divisions asexuées multiples donnent de nombreux parasites qui remplissent la cellule (3) et la font éclater. Cependant certains parasites contenant quatre noyaux se transforment en spores (4).

Les vers se contaminent par ingestion de feuilles souillées par les déjections de vers contaminés.

2.2.2. Chez les Poissons [44, 23]

Les microsporidies sont encore d'actualité en pisciculture, par exemple *Tetramicra brevifilum* chez le turbot (*Scophthalmus maximus L*). Le parasite se trouve dans le muscle du poisson [56]. On peut le rechercher par PCR avec une meilleure sensibilité qu'avec la microscopie (42% par PCR contre 25% par microscopie).

Les microsporidioses des poissons ont diverses localisations:

-localisation cutanée et sous-cutanée : genres *Pleistophora* (furonculose du poisson-chat, maladie du Néon tétra), *Glugea* (maladie nodulaire de divers poissons d'eau douce), et *Ichthyosporidium*.

-localisation branchiale : genre *Pleistophora* (parasite les branchies de la truite saumonée) et *Nosema*.

-localisation musculaire : genre *Pleistophora* et *Tetramicra*.

-localisations viscérales : genres *Glugea* (maladie nodulaire interne de Salmonidés, notamment de l'éperlan) et *Pleistophora*.

2.2.3.Chez les oiseaux

1.Psittacidés domestiques

- Perruche ondulée [4]

Le premier cas de microsporidiose à *Encephalitozoon hellem* (identification par PCR) a été décrit en 1997 dans un élevage de 180 couples, dans le Mississippi.

Alors que les analyses bactériologiques dans cet élevage sont négatives, on observe un niveau élevé de morbidité et de mortalité entraînant des pertes économiques importantes.

Il s'agit d'une microsporidiose entéro-hépatique à *E. hellem* chez des poussins de perruches ondulées, diagnostiquée par des méthodes histopathologiques de routine et confirmation du diagnostic par examens des parasites au MET.

Les autopsies ont donné les résultats suivants:

-distension du jabot par des graines, du bas intestin avec du gaz et un liquide jaunâtre.

-ascite moyenne

L'histologie a montré:

- une colonisation légère à sévère de la surface de la muqueuse du proventricule et colonisation sévère de la couche "koiline" du ventricule par des organismes morphologiquement caractéristiques de mégabactéries.

- une infection sévère des entérocytes avec des microsporidies intracytoplasmiques.

Les entérocytes les plus touchés sont ceux au sommet et sur les côtés des villi intestinaux, mais ceux des cryptes et des cellules de la lamina propria sont également touchés.

Les microsporidies mesurent 1.5-2.0x2-3 µm et sont souvent agrégées dans le cytoplasme apical.

On n'observe que peu ou pas d'inflammation associée aux microsporidies dans l'intestin.

-des foyers de nécrose hépatique

Ces foyers mesurent moins de 300µm de diamètre avec des macrophages et des microsporidies éparpillées.

On observe aussi des agrégats sphériques de microsporidies jusqu'à 40µm de diamètre dans les sinusoides hépatiques, sans qu'il y ai de réponse inflammatoire associée. Ces microsporidies sont pour la plupart incolores.

Les symptômes sont les suivants:

La maladie touche les poussins de moins de deux semaines et 75% des petits meurent

Les animaux atteints sont soit infectés de manière subclinique, soit naïfs envers les microsporidies.

Les autres oiseaux de volière déjà connus comme ayant été infectés par le genre *Encephalitozoon* sont des psittacidés, dont les inséparables blue masked (*Agapornis personata*) et les inséparables de Fischer (*Agapornis fischeri*) [56], les inséparables peach faced (*Agapornis roseicollis*) [51], une Amazone (*Amazona ochrocephala*)(infection par *E. cuniculi*) [53], des *Eclectus roratus* et un lori à raies jaunes (*Chalopsitta scintillata*) (infection par *E. hellem*) [64], mais aussi un oiseau n'appartenant pas aux psittacidés, l'autruche (infection par *E. hellem*) [61].

- Inséparables [56, 51]

La maladie évolue rapidement.

Les lésions les plus sévères se trouvent dans le foie (nécrose hépatique) ou dans le rein. Des parasites sont retrouvés dans le foie, le rein et l'intestin grêle, mais dans chacun de ces organes, l'inflammation est minime, voire nulle dans l'intestin.

- *E. cuniculi* chez une amazone [53].

Les signes cliniques ont débuté un mois après l'achat et ont duré deux semaines: perte de poids, diarrhée diminution de l'appétit, détresse respiratoire. Un traitement oral par de l'oxytétracycline, puis avec du chloramphénicol, enfin une administration de gentamicine injectable n'ont pas de résultats et l'oiseau meurt après quatre jours d'hospitalisation.

L'autopsie révèle un épaississement des sacs aériens, qui contiennent un exsudat blanc jaunâtre. Le foie est congestionné, sombre.

Des échantillons d'intestin, de foie, de cœur, de rein, de sac aérien et de poumon sont fixés par du formol tamponné, neutre, à 10%, puis sectionnés à 6 microns d'épaisseur.

A l'histologie, les reins sont congestifs, on observe de multiples sites de dégénération tubulaire avec des tubules dilatés contenant un fluide de coloration pâle. De nombreuses lumières tubulaires sont remplies d'organismes de forme ronde à ovoïde et basophiles. On en trouve aussi dans le cytoplasme de l'épithélium tubulaire.

Ces organismes ont une taille approximative de 1 à 2 microns et nombre d'entre eux contiennent une vacuole à membrane simple (single round vacuole). Ils sont gram positifs

On en trouve également dans le poumon, et dans la *lamina propria* de l'intestin grêle.

Les lésions touchant le poumon consistent en une congestion sévère des vaisseaux sanguins et la présence de sites de nécrose infiltrés d'hétérophiles et de cellules mononucléaires ainsi que de nombreuses bactéries. L'épaississement des sacs aériens est du à la prolifération de tissu et l'infiltration par des cellules hétérophiles et mononucléaires.

Le parenchyme hépatique est sévèrement congestionné et on observe de nombreuses accumulations focales de cellules de Kupffer chargées de pigments d'hémosidérine.

On trouve également une dégénérescence hépatocellulaire.

La microscopie électronique montre la présence de parasites protozoaires à l'intérieur de vacuoles dans le cytoplasme de cellules épithéliales des tubules rénaux. Dans ces vacuoles se trouvent des spores et diverses formes du développement parasitaire.

2. Autres oiseaux domestiques [28]

E. hellem a été identifié chez une autruche par identification génétique de l'extrémité 5' du gène ribosomal ssu rRNA. (276 bases). Cette microsporidie isolée de l'autruche n'a que deux bases de différence par rapport à celle isolée chez le perroquet *eclectus* et trois bases différentes par rapport à la même séquence de *E. hellem* isolé chez l'homme .

A l'heure actuelle, on n'a trouvé cette espèce microsporidienne à l'état naturel chez aucun autre animal que l'oiseau, qui pourrait être le réservoir naturel de *E. hellem*.

3.Oiseaux sauvages [64]

Des microsporidies *E. hellem* ont été trouvées chez un Lori sauvage.

Il s'agit d'un animal capturé dans la nature en Indonésie, mort après deux jours de quarantaine en Suisse. L'oiseau était en très mauvaises conditions physiques, avec une entérite subclinique et une coccidiose légère.

L'histologie montre au niveau du foie une légère hémosidérose des cellules de Kupffer. Aucun virus de la maladie de Newcastle n'est isolé du cerveau, du foie ou de la rate. Le contenu intestinal de l'oiseau est analysé par PCR et analyse séquentielle et contient des *E. hellem*.

Le fait de trouver cette microsporidie chez un oiseau vivant à l'état sauvage appuie l'hypothèse selon laquelle les oiseaux seraient les hôtes naturels et un réservoir de *E. hellem*.

2.2.4.Chez les mammifères domestiques

1.Chez le chien et le chat [35, 62, 72, 3]

La maladie causée chez le chien par la présence de *E. cuniculi* est la forme neurologique conduisant à la mort. L'encéphalitozoonose est diagnostiquée histologiquement: on retrouve des parasites dans le système nerveux central (cerveau) et les reins.

Cas particulier: microsporidies trouvées dans la cornée d'un chat

Un chat de 3ans et demi présente un blépharospasme de l'œil droit depuis 6 mois. La cornée centrale droite contient de nombreuses opacités superficielles en étoile; ces opacités ressemblent aux dépôts de cholestérol observés chez le chien.

On observe une inflammation modérée de la cornée, de la conjonctive et de l'uvée antérieure. Un traitement local étant sans effet notable, on procède à une kératectomie. Le tissu excisé est préparé pour la microscopie optique et électronique.

L'épithélium apparaît dégénéré à certains endroits. Une inflammation diffuse à travers tout le stroma inclut des cellules polymorphonucléaires et mononucléaires.

A l'intérieur de nombreuses petites poches entre les fibres stromale et à travers tout le tissu stromal se trouvent de nombreux organismes appartenant par leur caractères morphologiques au genre *Encephalitozoon*, mais l'espèce ne put être défini par manque d'échantillon frais.

2.Chez le lapin [34, 29]

Les spores apparaissent dans le rein 31 jours après inoculation et sont excrétées dans l'urine jusqu'à 3 mois après inoculation.

Symptômes:

De nombreux lapins porteurs sont asymptomatiques. Lorsque des symptômes apparaissent, il s'agit de troubles nerveux, oculaires ou du tractus urinaire [29].

La paralysie motrice chez le lapin à été décrite pour la première fois en 1922 .

Signes de torticolis:

Des lésions du système nerveux central (méningo-encéphalomyélite granulomateuse focale non suppurative locale, astrogliosis et infiltration périvasculaire lymphocytaire) ne se produisent normalement pas avant un mois après infection.

Torticolis plus souvent chez les jeunes lapins que chez les vieux et peut être accompagné par de l'ataxie et des roulements, ou d'une paralysie progressive

Signes oculaires

Une rupture spontanée de la cristalloïde et uvéite phacoclastique est observée de façon sporadique, d'habitude chez le jeune de moins de deux ans. Les lapins touchés ont une rupture de la cristalloïde et une uvéite sans historique de traumatisme oculaire. La lésion apparaît comme une masse blanche prenant origine au niveau de la cristalloïde avec un inflammation centrée autour du point de rupture. Le segment postérieur n'est pas touché. Des éléments parasitaires intra-lenticulaires ont été décrits comme étroitement associés avec l'épithélium de la cristalloïde.

L'inflammation associée est progressive et insensible à la thérapie, et l'énucléation est éventuellement requise. La pathogénie n'est pas connue, mais on envisage une infection in utero.

E. cuniculi a aussi été impliqué comme cause de cataracte bilatérale chez le lapin de laboratoire.

Signes rénaux

L'infection par *E. cuniculi* peut produire des lésions rénales consistants en foyers déprimés, pâles à plus foncés, irréguliers et circulaires sur le cortex rénal.

L'aspect histologique est une néphrite interstitielle avec infiltrat de cellules mononuclées et prolifération de tissu fibreux. [30].

Des signes cliniques urinaires et une incontinence résultent de l'infection du système nerveux central et non de lésions rénales.

Autres signes

Des lésions peuvent apparaître également dans le poumon. On peut identifier une pneumonie interstitielle histiocytique.

Dans le foie, des agrégats péri-portaux de lymphocytes peuvent se développer et persister des mois après l'infection initiale.

III. 2:

Cas de microsporidiose chez un lapin de compagnie [50]

Lapine de 7 semaines, de type lapin Angora de Jersey, sevrée très tôt et avec un antécédent de traumatisme 9 jours plus tôt.

Symptômes: troubles neurologiques sévères et progressifs, ayant commencé par une faiblesse du membre postérieur et manque d'équilibre. L'animal est faible et émacié et tremble légèrement de la tête; les réflexes nerveux sont diminués au niveau du train arrière.

A l'autopsie, on observe une faible masse musculaire et des reins pâles, mais pas de grosse lésion dans les autres tissus.

Des modifications histologiques sont rencontrées au hasard et de manière extensive le long du cerveau et de la corde spinale. On observe une infiltration méningée lymphoplasmocytaire, de nombreuses cellules gliales dans le parenchyme du cerveau et de la corde spinale et une accumulation sévère périvasculaire de lymphocytes dans le cerveau. A côté de laquelle ou à l'intérieur occasionnellement groupes denses d'organismes basophiles grands de 1.5*2 µm, coccobacillaires, bi-réfringent sous lumière polarisée et gram positif, compatible avec *E. cuniculi*.

Présence d'organismes dans les cellules endothéliales gonflées.

La rate, poumons, muscles squelettiques, foie et coeur contiennent des infiltrations lymphocytaires et macrophagiques périvasculaires multifocales et interstitielles avec des organismes associés à la myocardite.

Lésions rénales: néphrite multifocale chronique interstitielle, fibrose, atrophie tubulaire avec occasionnellement des inclusions d'organismes dans l'épithélium tubulaire.)

2.2.5. Chez l'animal de laboratoire

1.Le cochon d'Inde [38]

Une microsporidiose spontanée a été observée chez un cochon d'Inde de 36 jours. Durant l'étude, aucun signe nerveux n'est observé.

A 36 jours, l'autopsie révèle au niveau du cerveau une hypertrophie modérée des cellules endothéliales jouxtant les petits vaisseaux sanguins, et deux larges vacuoles d'approximativement 30-35 µm de diamètre, dans la matière grise corticale du lobe temporal. Ces vacuoles contenaient de nombreux organismes de forme ronde ou ovale, de 1.0 µm par 1.5-2.5 µm. La coloration de routine au bleu de toluidine donne une couleur bleue sombre aux microsporidies. Aucune réponse inflammatoire n'est détectée dans le tissu adjacent.

L'examen de l'ultrastructure de ces vacuoles parasitophores au MET montrent qu'elles contiennent les différents stades de développement d'une microsporidie correspondant morphologiquement à *Encephalitozoon cuniculi*.

La conclusion de l'article est que 50% des autres animaux du lot (8 cobayes) sont séropositifs sans trace histologique de microsporidie, donc qu'il faudrait faire systématiquement des tests sérologiques dans les laboratoires et élevages pour éradiquer les animaux contaminés.

2. Le singe rhésus [67]

En 1997, la maladie a été étudiée sur deux singes rhésus infestés 22 mois plus tôt par le virus SIV. Ils sont contaminés par *E. bienewisi*, issu d'un malade humain, par voie orale, alors que leurs taux de lymphocytes CD4+ ont chuté de 1100-2000 à 400/mm³.

Les deux singes restent asymptomatiques pendant 6 mois, puis décèdent des suites de l'infection par le SIV: septicémie aiguë, maladies associées au déficit immunitaire. Ils ne montrent à aucun moment de signes de diarrhée ou de maladie intestinale.

Cependant une excrétion de spores de *E. bienewisi* est constatée dans les selles dès les 7^e et 8^e jours après inoculation des microsporidies.

Les observations nécropsiques indiquent les conséquences de maladies opportunistes autres que microsporidiennes: cytomégalovirus, amibes, endocardite végétante, septicémie, *Mycobacterium avium*.

Des coupes de tissu intestinal colorées n'indiquent aucun foyer d'infection microsporidienne. Finalement seules quelques cellules contiennent discrètement des spores de microsporidies qui sont identifiées par hybridation in situ et microscopie électronique.

L'expérience est aussi tentée chez des singes immunocompétents, mais on n'observe ni excrétion de spores, ni symptômes de microsporidiose.

E. bienewisi a donc été transmis avec succès à des singes immunodéprimés, mais l'infection reste faible, bien que persistante, sans modification des muqueuses ni symptômes. On peut noter que les singes avaient des taux de lymphocytes CD4+ encore élevés jusqu'à leur mort, ce qui pourrait expliquer une certaine résistance à l'infection microsporidienne.

3. Diagnostic

3.1. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel des microsporidioses est très vaste, du fait du grand nombre d'affections plus fréquentes donnant les mêmes symptômes. Il est plus documenté chez le lapin.

3.1.1. Diagnostic différentiel de la microsporidiose du lapin [29]:

Les troubles oculaires peuvent évoquer un traumatisme.

Les troubles nerveux et le torticolis ont un grand nombre d'autres étiologies possibles:

- une gale auriculaire s'étant propagée à l'oreille interne. Le diagnostic est facile par observation de cérumen, abondant et jaunâtre, au microscope, ce qui permet de voir les acariens ou leurs oeufs.

- une otite suppurative moyenne causée par *Pasteurella multocida* ne montre pas souvent de preuve clinique d'infection. L'otite peut s'étendre dans l'oreille interne ce qui entraîne un torticolis. Occasionnellement on peut avoir un nystagmus. Les oreilles moyennes affectées sont caractérisées par des bulles tympaniques pleines de pus épais et jaune. On peut alors observer une rupture de la membrane tympanique. Le diagnostic se fait par une sérologie de type ELISA. Une rémission est possible si on applique un traitement antibiotique à l'aide de chloramphénicol, d'enrofloxacin ou de triméthoprime-sulfa. La réponse au traitement se fait dans la semaine.

- les suites d'un coryza même après rémission des symptômes de cette maladie.

- un dysfonctionnement vestibulaire avec torticolis ipsilatéral: soit central (lésion de la médulla ou du cervelet), soit périphérique dans l'oreille interne.

- une otite interne ou un dysfonctionnement vestibulaire secondaire à un traumatisme crânial. Cette étiologie peut être éliminée par examination physique poussée et grâce à une radiographie.

- une nématodiase cérébrale à *Baylisascaris procyonis*, avec de nombreux autres signes.
- une listériose.

3.1.2. Diagnostic différentiel de la microsporidiose humaine [8]:

Diagnostic différentiel chez l'homme:

On doit écarter la cryptosporidiose, l'isosporose, car ces maladies provoquent des diarrhées chroniques chez les personnes atteintes du virus du Sida, ainsi que les multiples causes de diarrhées chroniques, d'affection du rein ou du foie, de la cornée ou des sinus donnant les mêmes symptômes.

3.2. Méthodes de diagnostic

3.2.1. Examens complémentaires et prélèvements [43]

Examens complémentaires:

- Echographie: -on peut observer tout signe suggérant une cholangite: une hépatomégalie, une dilatation du tractus biliaire, ou encore des irrégularités de la paroi du tractus biliaire.
-on révèle également grâce à cette technique toute modification du rein, par exemple une masse cystique paracorticale du rein.
- Radiographie des sinus: on observe, par exemple, une opacification du sinus maxillaire.
- Examen ophtalmologique: dans les cas d'infection par *E. hellem*, on décèle une kératoconjonctivite superficielle.

Examens de laboratoire:

- La biopsie duodénale permet d'observer des microsporidies, après histologie et coloration de Giemsa, par exemple, dans la portion apicale des entérocytes et dans les macrophages de la *lamina propria mucosae*.
- Prélèvements de selles: en cas d'infection, elles contiennent de larges spores libres.
- Analyse d'urine, raclages conjonctivaux et nasaux: montrent la présence de nombreuses spores libres ou intracytoplasmiques.
- Prélèvements de sang pour la recherche d'anticorps.

On va donc demander des examens en fonction du type d'atteinte intestinale, urinaire, nasale ou oculaire. Ces prélèvements sont ensuite soumis à différentes techniques: coloration simple, méthodes sérologiques et moléculaires.

3.2.2. Recherche des spores par coloration [4, 8, 63, 69, 73]

Bien que l'amplification génique par PCR se développe, la méthode la plus utilisée est encore la coloration directe des selles. Cette technique permet d'établir un diagnostic de microsporidiose intestinale sans avoir à recourir à la biopsie intestinale.

"La qualité d'une coloration repose sur sa simplicité, sa rapidité de mise en œuvre, sur une coloration fine et précise de la spore permettant, par une identification sûre, une bonne spécificité et, enfin, sur la qualité du contraste avec le tapis de la lame, ce qui garantit une bonne sensibilité."

L'équipe du CHU de Nantes a mis au point un protocole alliant spécificité et sensibilité qui couple deux techniques colorimétriques: l'une au trichrome, appelée technique de Weber, qui a été évaluée comme la plus performante parmi d'autres techniques au trichrome, l'autre à base d'un agent chimiofluorescent se fixant sur la chitine de l'endospore (l'Uvitex 2B), mise au point par Van Gool [69].

La répartition des spores de microsporidies au sein d'une selle s'étant avérée homogène, on peut en obtenir une évaluation semi-quantitative.

Technique de Weber [73]

La solution de trichrome est composée de chromotrope 2 R (6g), de vert lumière (0.15g), d'acide phosphotungstique (0.7g), on y a ajouté 3 mL d'acide acétique glacial, on attend 30 min, puis on ajoute progressivement 100 mL d'eau distillée.

Les selles sont diluées au tiers dans du formol à 10%. On étale en frottis mince sur lame et on laisse sécher.

La lame est fixée au méthanol pendant 5 min, puis on la colore en l'immergeant dans la solution de trichrome pendant 90 min à température ambiante.

On différencie ensuite pendant 10 secondes dans de l'alcool acétique (5 mL d'acide acétique + 995 mL d'alcool à 90°).

Enfin on déshydrate en quatre étapes: 30 secondes dans l'éthanol à 95°, 5 min dans l'éthanol à 95°, 10 min dans l'éthanol à 100°; 10 min dans le toluène.

La lecture se fait après avoir ajouté de l'huile à immersion, à l'objectif 100.

On peut lui coupler la technique de Van Gool [69], qui manque de spécificité si le lecteur est peu expérimenté (il y a alors des faux positifs et des faux négatifs), mais sa sensibilité est meilleure que la coloration de Weber, en particulier dans les prélèvements faiblement positifs.

Autres colorations [4]

Après coloration à l'hémalun-éosine, les microsporidies apparaissent rondes à ovale et de couleur bleu pâle.

Après coloration gram, ou en coupes épaisses traitées à la résine colorée par du bleu de toluidine, elles sont bleu foncé.

La coloration de Steiner les fait apparaître de couleur brun foncé.

Avantages et inconvénients de cette technique de diagnostic [8]

Le seuil de sensibilité du diagnostic par coloration et observation au microscope ordinaire est de 10^6 spores par gramme de selles. En PCR, la sensibilité est de 100 spores par gramme.

En pratique, on diagnostique *E. cuniculi* par examen parasitologique des selles, frottis (coloration au trichrome ou par fluorescence directe: Uvibio); mais surtout par biopsie duodénale: on observe alors une atrophie villositaire et une inflammation de la muqueuse.

Par ailleurs, on peut avoir de faux négatifs liés au fait que l'individu infecté n'émet pas des spores en permanence: l'échantillon prélevé peut l'être au moment ou aucune spore n'est émise.

3.2.3. Méthodes sérologiques [70, 5]

Chez un individu immunocompétent infesté par des microsporidies, l'émission de spores dans le liquide cérébro-spinal ou l'urine est intermittente et a lieu seulement pendant une courte période. C'est pourquoi les tests sérologiques pourraient être d'une importance majeure pour le diagnostic de l'infection par *Encephalitozoon* chez les sujets immunocompétents.

Nous allons présenter des tests sérologiques fréquemment utilisés dans les publications: les tests ELISA, d'immunofluorescence, IFAT et CIA.

1. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Le principe est de fixer les anticorps recherchés entre, d'une part, les antigènes spécifiques fixés sur une membrane, et, d'autre part, des anticorps se liant aux immunoglobulines recherchées et marqués d'une enzyme. Après lavage, on ajoute un substrat de l'enzyme qui provoque l'apparition d'une coloration si le test est positif.

Ainsi, la concentration en anticorps sériques est proportionnelle à la densité optique dégagée par l'ensemble expérimental.

Différentes techniques de type ELISA sont utilisées en recherche. Elles varient d'une équipe à l'autre selon les solvants utilisés ou les temps d'incubation, entre autres [5, 70...].

III. 3: Exemples de protocole ELISA:

1)Préparation des antigènes chez le lapin [5]

On utilise des spores de *E. cuniculi* prélevées sur un lapin infecté spontanément. Elles sont diluées dans un tampon de Na_2CO_3 à pH 9.6 et les dilutions contenant 1.4×10^8 spores/mL sont étalées pendant 24 h à 22°C sur des lames à haute fixation (Greiner, Alphen aan de Rijn, Pays-Bas), qui sont conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

2)Test ELISAchez le lapin [5]

Les sérums sont dilués au 1/50^e dans du PBS à pH 7.2 contenant 1% de BSA. 100µL de cette préparation est mis en contact avec l'antigène pendant 1h à 37 °C, puis traité avec 100µL d'anti-immunoglobuline de lapin issu de sérum de chèvre et lié à une peroxydase. Le substrat utilisé ensuite est de la tétraméthylbenzidine dans du DMSO et on arrête la réaction après 10 min avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 2mol/L.

Les absorbances sont lues grâce à un multiscan Titertek à 450nm. Les tests ELISA sont considérés comme positifs si la densité optique des sérums dilués au 1/50^e est supérieure à la moyenne plus 4 SD des densités optiques observées pour les sérums de lapins issus de colonies indemnes d'*E. cuniculi*.

2. Test d'immunofluorescence indirecte [1, 5]

Le principe est l'utilisation de fluorochromes, des molécules qui, excitées par des UV, réémettent dans le visible (vert, orange, rouge). C'est cette réémission qui est observée avec un microscope à fluorescence.

L'antigène, en l'occurrence du matériel de spores microsporidiennes, est fixé sur une lame. On y ajoute le sérum à tester, puis un anticorps anti-immunoglobulines marqué par un fluorochrome.

Le test est positif si une fluorescence est observable.

Le test peut également servir à rechercher l'antigène dans les selles grâce à des anticorps obtenus antérieurement (Cf. test IFAT utilisé chez l'homme [1]) et des anti-anticorps marqués au fluorochrome.

III. 4: Exemples de protocoles de test d'immunofluorescence

Exemple de protocole pour le lapin [5]:

On prépare des lames portant l'antigène à partir d'une suspension de spores (2.5 mL de concentration 1.4×10^9 spores/mL) étalée sur les lames, séchée à l'air, fixée au méthanol et conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

On incube ces lames avec le sérum à tester (45 min à 37°C), puis elles sont lavées (3 fois au PBS, pH 7.2, à température ambiante), colorées pendant 30 min à 37°C avec des anti-immunoglobulines de lapin issues de sérum de chèvre et liées à du FITC (Dako Ltd, Glostrup, Danemark). Les lames sont enfin lavées trois fois avec du PBS, séchées à l'air et examinées au microscope à fluorescence au grossissement x200.

Les sérums sont d'abord testés à une dilution de $1/10^6$ dans du PBS, pH 7.2, puis les sérums positifs sont réexaminés en doublant les dilutions jusqu'au $1/2560^6$, ce qui permet de quantifier les anti-corps.

Test IFAT (immunofluorescence technique) chez l'homme:

-Recherche des anticorps [70]:

L'antigène est préparé à partir de suspensions de cellules (RK13) infectées par *E. intestinalis*. On applique 10 μL de la suspension cellulaire dans chaque emplacement de lames à 12 trous. Après incubation à 37°C durant une nuit dans une atmosphère humide avec 5% de CO_2 , les lames sont lavées dans du PBS (37°C), séchées à l'air, fixées dans de l'acétone froide (-20°C) pendant 20 min, et conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

Avant utilisation, les lames sont lavées avec de l'eau distillée pendant 5 min. Chaque échantillon de sérum est dilué dans du PBS (dilutions allant de $1/20^6$ à $1/320^6$). Pour chaque lame, 10 μL de sérum dilué (10 μL de PBS pour le contrôle négatif) sont incubés 30 min à 37°C en atmosphère humide, puis lavés deux fois dans du PBS, rincés à l'eau distillée et séchés à l'air. Des IgG anti-humain (Fc et Fab) liés à de l'isothiocyanate de fluorescéine (10 μL /emplacement, de dilution $1/60^6$; Nordic) sont incubés avec les lames à 37°C pendant 30 min.

Ces lames sont ensuite à nouveau lavées (deux fois dans du PBS et une fois à l'eau distillée), séchées à l'air, et recouvertes de milieu de montage (H-1000 Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA) et d'un film de couverture.

Les lames sont enfin examinées au grossissement x 630 du microscope à fluorescence de Leitz.

Pour les tests IFAT avec *E. hellem* et *V. corneae*, des cellules infectées par l'une de ces deux espèces de *Microspodia* sont utilisées comme antigène. Les lames de contrôle sont couvertes avec des préparations cellulaires non infectées.

-Recherche des antigènes [1]:

On utilise deux types d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la paroi des spores de *E. bienewisi* et *E. intestinalis* (6E52D9 et 3B82H2).

Les échantillons de selles à tester sont filtrés, centrifugés et remis en suspension, puis on en dépose 2 μL dans chaque emplacement d'une lame à 18 trous. On sèche à l'air, à température ambiante, et on traite avec de l'acétone à -20°C pendant 10 min. On ajoute ensuite les anticorps, à raison de 20 μL dans chaque emplacement, et on fait incuber 30 min à la température de la pièce.

Les lames sont ensuite lavées (3 fois au PBS), puis on ajoute 20 μL d'anticorps de chèvre, à une dilution de $1/100$, marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine, et dirigés contre les anticorps de souris utilisés précédemment (anti-IgG-IgM-IgA, Sigma-Aldrich Chimie, St-Quentin-Fallavier, France). Cette suspension d'anticorps contient aussi un colorant de comptage, le bleu Evans.

L'ensemble est incubé en chambre humide pendant 30 min à température ambiante.

Après lavage, les lames sont montées avec un fluide de glycérol (Immu-mount, Shandon Inc.), et les spores sont visualisées au microscope à épifluorescence de Leitz, Laborlux (450 nm, grossissement x1000).

Les contrôles positifs et négatifs se font par des selles de personnes testées par PCR.

Ce test demande une durée de 3h 5min, contre 8h pour le test PCR.

3. CIE (Counterimmunoelectrophoresis= immunoelectrophorèse)

Le principe est de faire migrer par électrophorèse sur gel le sérum et l'antigène. La migration se faisant en fonction du poids moléculaire, le complexe antigène-anticorps peut être repéré par un trait de précipitation différent de ceux correspondant au sérum seul ou à l'antigène seul.

III. 5: Exemple de protocole CIE [70]:

Les gels CIE sont préparés par dissolution de 0.2 g d' agar purifié (L28; Oxoid, Basingstoke, Grande-Bretagne) à la chaleur dans 25 mL de tampon Veronal (0.01 M d'acide diethylbarbiturique, 0.05 M de sel de sodium et acide diethylbarbiturique, pH 8.7). L'agar est saupoudré sur un film Gelbond de 0.2mm (110 x 125; Bio-Rad, Richmond, CA) et laissé à solidifier 60 min.

Dans l'emplacement de l'anode, on place 16 µL de sérum non dilué, et, après un délai de 10 min, on place 16 µL de la préparation antigénique (0.5 mg/mL) sur l'emplacement de la cathode. L'immunoélectrophorèse est faite à 70 V et 20 mA dans un tampon Veronal pendant 80 min. Après précipitation une nuit à 4°C, les gels sont lavés dans du NaCl à 0.9%, séchés, colorés au bleu de Coomassie, décolorés, séchés à l'air, et les lignes de précipitation sont examinées.

Les tests CIE de *E. hellem* et *V. corneae* sont faits avec les préparations antigéniques appropriées.

4. CIA (Carbonimmunoassay, test d'agglutination)

Il s'agit de repérer, grâce à une coloration du sérum, l'agglutination des anticorps recherchés avec l'antigène préalablement fixé sur une lame.

III. 6: Exemple de protocole CIA [5]:

L'antigène (Testman, Uppsala, Suède) est étalé sur des lames, séché à l'air, fixé à la flamme et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Les sérums sont utilisés après dilution au 1/20^e dans du PBS à pH 7.2. 5µL de sérum dilué est mélangé à la même quantité d'encre India et laissé sur la lame pendant 5 min. Après lavage au PBS afin d'éliminer toute l'encre, les lames sont examinées au microscope optique au grossissement x400.

Les sérums positifs sont réexaminés après qu'on ait doublé la dilution jusqu'au 1/2560^e.

5. Avantages et inconvénients des méthodes sérologiques [29, 1, 5]

- Chez le lapin [29], un titre positif à *Encephalitozoon* accompagné de signes cliniques suggère une encéphalitozoonose mais n'est pas concluant. En effet, l'animal a pu être en contact avec l'antigène et avoir produit des anticorps, mais il peut ne plus être porteur de microsporidies.

On procède donc à un test sérologique (par fixation du complément, dot-ELISA, immunoréaction à l'encre India, immunofluorescence indirecte, ou microagglutination sont le plus souvent utilisés).

D'ailleurs, étant donné la nature moins quantitative du test ELISA, une détermination quantitative des anticorps devrait être faite plutôt par un test d'immunofluorescence [5].

Mais le diagnostic définitif de l'encéphalitozoonose demande, en plus, une identification histopathologique du parasite par coloration.

Cependant, dans le cadre de lapins de laboratoire, il suffit de savoir si la colonie est indemne ou non de microsporidies (*E. cuniculi*). Donc les tests sérologiques sont suffisants. Ils sont même tout à fait adaptés pour le suivi sanitaire périodique des lapins de laboratoire tel qu'il est recommandé par la Fédération des associations européennes de la science des animaux de laboratoire (FELASA) [41]. C'est en tout cas le cas des test ELISA, d'immunofluorescence et CIA [70].

- Chez l'homme, les techniques immunologiques ne permettent pas de distinguer les espèces du genre *Encephalitozoon*: *E. intestinalis* et *E. hellem*; cependant cela semble de peu d'importance, à l'heure actuelle, ces deux espèces pouvant être efficacement combattues par le même traitement (Cf. 4.)

De plus, une étude menée cette année au Mali [1], sur des adultes séropositifs et des enfants immunocompétents, le test IFAT sur échantillons de selles a une sensibilité et une spécificité à 100% comparable à celle de la PCR, tout en étant moins coûteux et plus rapide. Il serait donc judicieux de l'utiliser en première intention dans les pays en développement.

Dans le domaine de la recherche, de nombreuses combinaisons de tests immunologiques ont été essayées et adoptées par certains laboratoires. Ainsi, pour leur enquête à grande échelle sur la prévalence des personnes immunocompétentes et séropositives aux microsporidies, van Gool *et al* [70] ont décidé de considérer comme positif à *Encephalitozoon* un sérum dont le titre ELISA est ≥ 800 , celui en IFAT^F est ≥ 80 , et qui provoque une ligne de précipitation en CIE.

3.2.4. Méthodes moléculaires: [18, 11]

1. La PCR (Polymerase chain reaction= réaction de polymérisation en chaîne) [18]

Afin de distinguer les trois genres de l'espèce *Encephalitozoon*: *E. hellem*, *E. cuniculi* et *E. intestinalis*, les méthodes immunologiques (ELISA) ne sont pas suffisantes. La PCR, en revanche, permet de les identifier.

Cette technique permet d'isoler une séquence particulière du génôme et de l'amplifier un grand nombre de fois, de sorte qu'on considère que la quantité de génôme entier de départ est négligeable en comparaison du nombre d'exemplaires de la séquence que l'on a obtenus.

Dans le cas des microsporidies, on amplifie les gènes ribosomiaux, à raison d'une séquence d'environ 1000 paires de bases. Cette séquence inclut une large portion du gène de la petite sous-unité d'ARNr, la région intergénique en entier et une petite portion du gène de la grande sous-unité ARNr. Les amorces utilisées font que l'amplification est spécifique de la microsporidie recherchée.

Après purification de l'ADN, ce dernier est incubé dans un thermocycleur avec une enzyme, la Taq polymérase, qui polymérise l'ADN, ainsi que les amorces qui délimitent la région à

amplifier, un tampon adapté à l'activité de l'enzyme, qui stabilise l'hybridation des amorces, et dont la concentration permet de jouer sur la fidélité et la spécificité de l'attaque enzymatique.

L'ADN est d'abord dénaturé par chauffage pendant 1 min à 94°C, puis le cycle se poursuit par 1 min à 40°C, ce qui correspond à l'hybridation des amorces, enfin une séquence de 2 min à 72°C permet l'élongation du nouveau brin par l'ADN-polymérase.

Le cycle est recommencé en moyenne 30 fois. On a ainsi multiplié le fragment bordé par les amorces.

Le produit de la PCR est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

2. Migration sur gel [18]

On procède ensuite à une migration de ces fragments par électrophorèse sur gel d'agarose (technique de Southern blot). Lorsque le test est positif, on observe les bandes de migration correspondant aux fragments d'ADN que l'on souhaitait amplifier.

3. Autres techniques

Les produits de la PCR peuvent également être soumis aux techniques de RFLP (PCR restriction fragment length polymorphism): les produits de la PCR sont digérés toute une nuit avec une endonucléase puis les fragments sont soumis à l'électrophorèse dans 2% d'agarose, colorés avec du bromure d'éthidium et photographiés sous éclairage UV.

Enfin, une autre technique est le test de formation des hétéroduplexes (Double-stranded DNA heteroduplex mobility assay). Les produits amplifiés par PCR sont chauffés à 95°C, et refroidis à la température de la pièce pour permettre la formation de duplexes au hasard. Les homoduplexes, qui indiquent une association de fragments homologues d'ADN, et les hétéroduplexes, qui migrent plus lentement à cause des changements conformationnels résultant de l'assemblage de séquences d'ADN non correspondantes, sont visualisés après électrophorèse et coloration.

III. 7: Exemple de processus de diagnostic complet de microsporidiose à *E. cuniculi* mis en œuvre chez un patient atteint de SIDA [28]

1) Suspicion clinique:

Un homme de 48 ans atteint de Sida déclaré depuis quatre ans développe une conjonctivite bilatérale et une sinusite frontale et maxillaire accompagnée de multiples polypes nasaux. Malgré les traitements antibiotique et décongestionnant mis en œuvre, des conjonctivites épisodiques avec larmoiement important et des rhinites sévères avec obstruction nasal se renouvellent. Outre ces deux manifestations cliniques, les autres examens physiques donnent des résultats normaux, si ce n'est une immunodéficience sévère et une augmentation des enzymes hépatiques.

Des spores microsporidiennes sont alors trouvées dans le mucus nasal et un écouvillonnage conjonctival. D'autres prélèvements sont alors effectués: sputum, urine, selles et biopsies intestinales; tous contiennent des spores.

2) Microscope optique:

On utilise des colorations à base de chromotrope, de Giemsa et de Gram.

On observe des spores ovoïdes de $1.5-2.5 \times 0.7-1.5 \mu\text{m}$ dans l'écoulement nasal, les écouvillons nasaux, le sputum, l'urine et les selles, mais surtout dans les biopsies intestinales, par coloration au bleu de toluidine.

Mais pas de découvertes histologiques liées à la présence de microsporidies dans l'épithélium intestinal.

3) Microscope électronique: Dans l'écoulement nasal et la biopsie duodénale, on observe des spores matures de même dimension et des immatures incluant mérontes, sporontes, sporoblastes dans une vacuole parasitophore dans quelques cellules hôtes.

On observe 5 à 7 tours du filament polaire sur une simple ligne, ce qui donne le genre *Encephalitozoon*.

Les mérontes sont ronds à ovoïdes et proches de la membrane vacuolaire. Les sporontes sont libres, au centre de la vacuole. Les nuclei sont impairs. On ne trouve de septation dans la vacuole d'aucune cellule.

4) Technique d'immunofluorescence indirecte:

On utilise des lames recouvertes d'une dilution au $1/400^{\circ}$ d'antisérum polyclonal de lapin à *E. intestinalis*, *E. cuniculi* et *E. hellem* et d'anticorps monoclonaux de souris contre *E. hellem*. Les premiers antisérums sont obtenus en injectant à des lapins des spores produites in vitro sur cultures de cellules rénales de singe. Le dernier est produit sur une souris immunosupprimée.

Les microsporidies de l'écoulement nasal réagissent très fortement (intensité 4+) avec l'antisérum à *E. cuniculi* et produisent une fluorescence vert pomme des parois et du contenu. On n'observe pas de fluorescence avec les autres antisérums.

Les spores sont donc identifiées comme *E. cuniculi*.

4. Traitement et prophylaxie

4.1. Molécules disponibles [19, 20, 75]

Relativement peu de molécules ont été étudiées pour leur utilisation éventuelle contre les microsporidioses humaines.

4.1.1. L'albendazole

Il s'agit du nom générique du méthyl[5-(propylthio)-1-H-benzimidazol-2-yl] carbamate, un anthelminthique.

Il semblerait qu'il ait une haute affinité pour le site de fixation de la colchicine des dimères de tubuline et il interférerait ainsi avec la polymérisation de ces dimères dans les microtubules des parasites.

4.1.2. La fumagilline

C'est un antibiotique utilisé de façon extensive contre la microsporidie *Nosema apis* chez les abeilles. Il semble que cette molécule agisse en inhibant la multiplication du parasite, mais elle n'aurait pas d'effet toxique direct sur les spores. (altère la paroi sporale [23]). In vitro, on a montré son action inhibitrice de la croissance, mais une application thérapeutique chez l'homme est difficile à mettre en place.

4.1.3 Le métronidazole

Il a été utilisé chez l'animal de compagnie, mais aussi chez l'homme, avec quelque succès dans le cas de *E. bienewisi*.

4.1.4. Autres molécules

Clotrimazole [63], octreotide et triméthoprim-sulfaméthoxazole [19] sont cités de façon anecdotique.

4.2. Prévention et traitement de l'homme

Chez l'homme, la prévention est très peu documentée, puisqu'on ne connaît pas les sources du parasite. Les seuls moyens préconisés, à l'heure actuelle, sont un lavage correct des mains, et une manipulation attentive des fluides biologiques infectés [9].

Dans le cadre du traitement d'un patient HIV positif ou ayant développé un SIDA, la première des thérapies est, autant que possible, la restauration immunitaire, par exemple via une trithérapie [8].

Le traitement spécifique des microsporidioses est encore à améliorer, en particulier dans le cas de *E. bienewisi*, mais pour le genre *Encephalitozoon*, des molécules ont fait leurs preuves.

4.2.1. Traitement des microsporidioses *Encephalitozoon* spp [13, 28, 18, 76].

La molécule classiquement utilisée, à l'heure actuelle, est l'albendazole.

Une infection par des genres de l'espèce *Encephalitozoon* diagnostiquée à la fois chez l'homme (*E. cuniculi*, *E. intestinalis* et *E. hellem*) et chez des lapins (*E. cuniculi*) a été traitée avec succès chez les deux espèces par de l'albendazole (400mg deux fois par jour pendant 2-3 semaines. Aucune nouvelle infection par *Encephalitozoon* n'est diagnostiquée durant les 14 mois d'observation suivants [13].

1. Cas des microsporidioses intestinales.

Une étude menée en Zambie a montré que le traitement par l'albendazole (800mg, 2 fois par jour pendant 14 jours) de patients atteints de diarrhée chronique persistante liée au SIDA permet de réduire la virulence de l'infection protozoaire (cryptosporidiose, isosporiasis, microsporidioses confondues) chez 39% de 87 patients, au bout de six semaines de traitement.

L'albendazole permet aussi de reconstituer la muqueuse intestinale, mais seulement chez les patients répondant au traitement. Le marqueur de cette amélioration est la profondeur des cryptes intestinales, mesurée par biopsie, microscopie électronique et morphométrie. Cette profondeur augmente de 15% en six semaines de traitement [76].

Les doses utilisées dans les hôpitaux occidentaux sont plus faibles [43]: 400 mg d'albendazole deux fois par jour per os. Tous les symptômes diminuent progressivement, même la cholestase et la leucocyturie. Au bout de deux semaines, on observe une nette diminution du nombre de spores dans l'urine, les selles et les prélèvements conjonctival et nasal.

On n'observe plus rien d'anormal à 28 jours, ni à 16 semaines.

Il faut désormais attendre pour prouver une efficacité à long terme après la fin du traitement.

2. Cas des microsporidioses respiratoires

Dans le cas d'une infection par *E. cuniculi* causant une sinusite, le traitement est d'une dose de 400mg, per os, deux fois par jour, pendant quatre semaines, on observe rapidement une diminution des symptômes nasaux et une rémission de la conjonctivite.

A la fin du traitement, on ne relève plus spores dans les écouvillons nasaux [28].

3. Cas des microsporidioses oculaires

On instaure un traitement local par une solution à 0.03% de fumagilline, dans chaque œil, toutes les heures, et de l'albendazole par voie orale (200mg, deux fois par jour).

La réponse est rapide et les symptômes oculaires sont supprimés en un mois [18]

4.2.2. Cas particulier de *E. bienewsi*. [19]

Une équipe new-yorkaise a évalué en 1994 l'efficacité du traitement à l'albendazole (2 comprimés de 200 mg, deux fois par jour) sur 29 patients HIV positifs et atteints de microsporidiose intestinale révélée à l'observation des selles en microscopie électronique et due à *E. bienewsi*, et souffrant de diarrhée chronique.

Les éléments pris en compte sont la réponse clinique et la persistance ou non des spores dans l'intestin grêle, évaluée par endoscopies et biopsies répétées.

Ce traitement n'entraîne pas d'effets secondaires significatifs. La moitié des patients ont une bonne réponse, 34.6% une réponse partielle; pour 15.4%, le traitement est considéré comme un échec.

Le nombre de passages à la selle est diminué de façon significative, mais l'arrêt du traitement provoque une rechute, sa reprise une amélioration. Les biopsies montrent une persistance de l'infection même après un mois de traitement. Enfin, le doublement de la dose n'a d'effet que sur une des personnes sur quatre qui ne répondaient pas.

Ainsi l'albendazole n'est pas capable d'éliminer *E. bienewsi* de l'intestin des malades.

Or l'albendazole ne semble efficace que sur les microsporidies qui se développent dans une vacuole parasitophore (*Encephalitozoon* spp.) [28], ce qui n'est pas le cas d' *E. bienewsi*. Dans le genre *Encephalitozoon*, l'albendazole est parasiticide.

La sélectivité dans la toxicité de cette molécule, pourrait, aussi, être due au fait qu'il existe des différences entre les espèces dans la cinétique de l'interaction benzimidazole-tubuline. Des concentrations faibles en albendazole se fixeraient de manière réversible chez *E. bienewsi*, ce qui expliquerait la résurgence des symptômes à l'arrêt du traitement. Cependant un doublement des posologies n'est pas toujours efficace.

Des études supplémentaires sont nécessaires sur d'autres molécules ou sur une synergie de molécules afin de pouvoir éliminer la présence de *E. bienewsi* de façon aussi efficace que ce qui est possible dans le cas de *Encephalitozoon* spp. La fumagilline semblerait donner de bons résultats par voie orale, ainsi que le métronidazole [7, 68].

4.3. Prévention et traitement des lapins. [36]

Pour éviter une contamination horizontale, on diminue la contamination par l'urine en utilisant des biberons à eau et en plaçant la nourriture du lapin au-dessus du sol [29]. Les lapins infectés devraient être isolés.

On peut aussi utiliser une prévention médicalisée [36].

Un traitement prophylactique par le fenbendazole (20 mg/kg de poids vif/jour) sept jours avant administration à des lapins d'une dose infectieuse de *E. cuniculi* a prévenu l'installation de parasites, comme l'on confirmé la sérologie négative et l'absence de formes parasitaires dans le système nerveux.

De même, des lapins traités par le fenbendazole durant quatre semaines après administration orale de *E. cuniculi*: aucune trace de formes parasitaires n'est mise en évidence dans le cerveau.

Ce médicament pourrait donc être utilisé à bon escient chez les lapins de compagnie ou de rente. Comme l'albendazole, le fenbendazole est bien absorbé et rapidement métabolisé en oxfendazole, actif in vitro contre *E. cuniculi* et *E. intestinalis*. Ses avantages sont que, contrairement à l'albendazole, il n'est pas embryotoxique ou tératogène.

En revanche, chez le lapin présentant déjà des troubles neurologiques et des titres supérieurs à 1:640, un traitement de quatre semaines n'est efficace que dans environ 50% des cas. Un traitement de même durée par des corticoïdes permet un résultat similaire [24], ce qui peut être rapproché du fait que les signes nerveux sont liés à une inflammation granulomateuse causée par les parasites.

Afin d'améliorer la réponse des lapins montrant des signes d'encéphalitozoonose, un couplage des deux thérapies est donc envisageable.

5. Perspectives

5.1. Parallèle entre SIDA et microsporidiose: divergences des intérêts Nord/Sud

Le rapport le plus récent rendu par l'ONU-SIDA (décembre 2002) [52] fait état de 42 millions de personnes atteintes de Sida dans le monde, pour la plupart en Afrique [29.4 millions] et en Asie du Sud-Est [6 millions]. En Afrique, l'épidémie est comparable aux épidémies de peste qui ont touché l'Europe au Moyen-Âge et l'ont vidée de la moitié de sa population. Toutes les catégories sociales sont touchées (par exemple, jusqu'à 20% des enseignants dans certains pays d'Afrique australe).

En Europe, en revanche, l'épidémie progresse plus lentement, visant des populations marginalisées, et on cherche plutôt à l'heure actuelle à éviter aux personnes séropositives de déclarer la maladie, en particulier grâce aux polythérapies visant à reconstituer un niveau immunitaire correct.

Parallèlement, on traite efficacement les microsporidioses de type *Encephalitozoon*, alors que celle liée à *E. bienersi*, répond moins bien aux traitements actuels. On cherche à développer la prévention. De plus, les microsporidioses intestinales sont de moins en moins rapportées suite à l'introduction de traitements anti-rétroviraux adaptés.

Dans les pays sous-développés, le passage à la phase de Sida déclarée est quasi systématique par manque de traitements, trop coûteux, et, pour les mêmes raisons, les microsporidioses qui seraient soignées dans les pays riches ne le sont pas ici.

5.2. Développement des méthodes de diagnostic et des traitements Dépistage à systématiser

Selon une étude menée récemment au Mali [1], sur des adultes séropositifs et des enfants immunocompétents, le test IFAT sur les selles a une sensibilité et une spécificité à 100% comparable à celle de la PCR, tout en étant moins coûteux et plus rapide. Il serait donc judicieux de l'utiliser dans les pays en développement.

De plus, nous avons vu que le traitement par l'albendazole est radical sur, au moins, une partie des agents responsables. Cependant, il n'est peut-être pas systématiquement utilisé, par manque de moyens.

Mais la meilleure façon d'éviter les microsporidioses serait encore de retarder le passage à un Sida déclaré, par la démocratisation des trithérapies.

Dans les pays développés, le dépistage n'est pas toujours systématique, alors qu'on a vu qu'il pourrait être instauré, en particulier en gérontologie dans les cas de diarrhée chronique.

5.3. A la recherche des sources: un rôle pour les vétérinaires

On a vu que le caractère zoonotique de certaines microsporidies est établi, et qu'il est plus qu'envisagé chez d'autres. La question du réservoir naturel pourrait être réfléchié par les vétérinaires, par la mise en place d'enquêtes sérologiques ou de colorations des selles. Des tests en kits existent mais sont peu répandus, même si nos confrères allemands semblent plus sensibilisés au problème [24]. Au Japon, également, des enquêtes épidémiologiques sur *E. cuniculi* sont en cours sur les lapins et l'homme [31, 49].

Les vétérinaires, en milieu praticien ou en milieu sauvage, disposent d'un nombre impressionnant d'animaux susceptibles d'être testés, nombre qu'il serait plus qu'intéressant d'exploiter.

Conclusion

Les microsporidioses sont de nouvelles maladies sur lesquelles on sait encore peu. Leurs agents ont été découverts récemment chez l'homme, et déclarés nouveaux agents opportunistes dans l'épidémie de Sida, mais on les connaissait déjà chez les animaux, en particulier chez les animaux de laboratoire.

La pathogénie est inconnue chez de nombreuses espèces. Les interactions hôte-parasite sont bien étudiées chez la souris dans le cadre du système immunitaire, mais pas en ce qui concerne les autres moyens de défense de l'hôte. Il est raisonnable de supposer que les mécanismes de défense de l'hôte sont également importants chez l'homme et d'autres animaux que la souris, mais cela n'a pas été formellement établi.

La microsporidiose était connue jusqu'alors surtout chez le lapin, pour lequel les symptômes sont classiques. Les infections spontanées chez d'autres animaux sont rarement rapportées. En revanche, chez l'homme, les symptômes sont extrêmement variés, selon l'agent en cause et l'historique médical du patient.

Il reste de nombreuses questions sans réponses quant à ces maladies chez l'homme. Les personnes développent-elles des infections persistantes? Quelles est l'épidémiologie chez l'homme? Est-ce que de nombreuses personnes portent le parasite et ne développent la maladie que lors d'une immunodépression? La transmission se fait-elle de manière horizontale, et si oui, comment? La transmission verticale, bien que démontrée chez certains animaux, n'a pas été démontrée chez l'homme.

Les scientifiques ont été très tôt orienté vers l'hypothèse de la zoonose, mais les sources et les modes de contamination de l'homme ne sont pas encore connues. Les vétérinaires pourraient prendre un rôle important dans la recherche des réservoirs de la maladie.

Les méthodes de diagnostic, quant à elles, sont aujourd'hui très développées, en particulier en milieu hospitalier occidental et dans la recherche, mais il manque des kits moins coûteux pouvant être utilisés dans les pays en développement.

Enfin, si on ne connaît pas de moyen de prévention spécifique, les traitements sont à l'heure actuelle très efficaces dans le cas du genre *Encephalitozoon*, mais toujours en attente de mieux en ce qui concerne les plus fréquent, *E. bienewisi*.

Bibliographie

- 1- ALFA CISSE, O., OUATTARA, A.; THELLIER, M. *et al.*
Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali).
J Clin Microbiol 2002, **40**(5), 1715 -1718.
- 2- AOUN, K., BOURATBINE, A., DATRY, A. *et al.*
Présence de microsporidies intestinales en Tunisie: à propos d'un cas.
Page du site internet de l'Institut Pasteur, consultée le 10/08/2002.
Web: (<http://www.pasteur.fr/sante/socpatex/pdf/1997n3/Aoun.pdf>)
- 3- ASMUTH, D.M., DEGIROLAMI, P.C., FEDERMAN, M., *et al.*
Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS.
Clin Inf Dis, 1994, **18**: 819-825.
- 4- BLACK, S.S., STEINOHRT, L.A., BERTUCCI, D.C., *et al.*
Encephalitozoon hellem in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*).
Vet Pathol, 1997, **34**, 189-198.
- 5- BOOT, R., HANSEN, A.K., HANSEN, C.K. *et al.*
Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits.
Lab Anim, 2000, **34**, 281-289.
- 6- BORNAY-LLINARES, F.J., DA SILVA, A.J., MOURA, H. *et al.*
Immunologic, microscopic and molecular evidence of *E. intestinalis* infection in mammals other than humans.
J Inf Dis, 1998, **178**, 820-826.
- 7- BOTTEREL, F., MINOZZI, C., VITTECOQ, D. *et al.*
Microsporidiose intestinale et pulmonaire à *E. bienewisi* chez un patient infecté par le VIH.
Bulletin de la Société Française de Parasitologie, 2000, tome **18**, numéro 1.
- 8- BOUREE, P.
Microsporidies.
In: Aide-mémoire de parasitologie et de pathologie tropicales, 3^e édition, Médecines et Sciences, Flammarion Ed., 2001, 159-160.
- 9- BRYAN R.T.
Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection.
Clin Inf Dis, 1995, **21**(Suppl 1), 562-565.
- 10- CISLAKOVA, L., LITERAK, I., BALENT, P. *et al.*
Prevalence of antibodies to *E. cuniculi* in angora goats - a potential risk of infection for breeders.
Ann Agric Environ Med, 2001, **8**(2), 289-291.

- 11- DEL AGUILA, C., LOPEZ-VELEZ, R., FENOY, S. *et al.*
Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis.
J Clin Microbiol, 1997, **35**(7), 1862-1866.
- 12- DENGJEL, B., ZAhLER, M., HERMANNs, W. *et al.*
Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*.
J Clin Microbiol, déc 2001, **39**(12), 4495-4499.
- 13- DEPLAZES, P., MATHIS, A., BAUMGARTNER, R. *et al.*
Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite.
Clin Inf Dis, Mars 1996, **22**(3), 557-559.
- 14- DEPLAZES, P., MATHIS, A. VAN SAANEN, M., *et al.*
Dual microsporidial infection due to *Vittaforma corneae* and *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS.
Clin Inf Dis, 1998, **27**, 1521-1524.
- 15- DESPORTES I.
Evolution de la notion de spécificité parasitaire chez les microsporidies [online].
In: Ecole doctorale du Muséum, année universitaire 2000-2001: Evolution des parasites et des relations hôtes-parasites. 2-3-4 mai 2001.
Web:(<http://www.mnhn.fr/mnhn/bpph/Enseignement/Evolution2001.htm>)
- 16- DIDIER, E.S., DIDIER, P.J., FRIEDBERG, D.N. *et al.*
Isolation and characterization of a new Human Microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis.
J Inf Dis, 1991a, **163**, 617-621.
- 17- DIDIER, E.S., DIDIER, J.D., SNOWDEN, K.F., SHADDUCK, J.A.:
Microsporidiosis in Mammals.
Microbes and Infection, 2000, **2**, 709-720.
- 18- DIDIER, E.S., ROGERS, L.B., BRUSH,A.D. *et al.*
Diagnosis of disseminated microsporidian *Encephalitozoon hellem* infection by PCR-Southern analysis and successful treatment with albendazole and fumagillin.
J Clin Microbiol, 1996, **34**(4), 947-952.
- 19- DIETERICH, D.T., LEUR, E.A., KOTLER, D.P *et al.*
Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS.
J Inf Dis, 1994, **169**, 178-183.

- 20- DORE, G.J., MARRIOTT, D.J., HING, M.C., *et al.*
Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus: response to therapy with albendazole.
Clin Inf Dis, 1995, **21**, 70-76.
- 21- EL FAKHRY, Y., ACHBAROU, A., DESPORTES-LIVAGES, I. *et al.*
Humoral responses in Interferon gamma receptor knockout mice infected with a microsporidium pathogenic in AIDS patients.
Exp Parasitol, 1998, **89**, 113-121.
- 22- ENRIQUEZ, F.J., TAREN, D., CRUZ-LOPEZ, A. *et al.*
Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico.
Clin Inf Dis, 1998, **26**, 1227-1229.
- 23- EUZEBY, J.
Protozoologie médicale comparée.
Vol. II: Les protozooses des animaux et leurs relations avec les Protozooses de l'homme.
Fondation Marcel Mérieux Ed., 1987, 34-72.
- 24- EWRINGMANN, A., GÖBEL, T.
Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Encephalitozoonose beim Heimtierkaninchen.
(Etude de la clinique et du traitement de l'Encéphalitozoonose chez le lapin de compagnie)
Kleintierpraxis, 1999, **44**, 357-372
- 25- FIELD, A.S., MARRIOT, D.J., MILLIKEN, S.T. *et al.*
Myositis associated with a newly-described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS.
J Clin Microbiol, 1996, **34**(11), 2803-2811.
- 26- FOUCAULT, C., DRANCOURT, M.
Actin mediates *E. intestinalis* entry into the human entérocytes-like cell line Caco-2.
Microb Path, 2000, **28**, 51-58.
- 27- FRANZEN, C., MÜLLER, A.
Microsporidiosis : human diseases and diagnosis.
Microbes and infection, 2001, **3**,349-400.
- 28- FRANZEN, C., SCHWARZ, D.A., VISVESVARA, G.S., *et al.*
Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS.
Clin Inf Dis, 1995, **21**, 1480-1484.
- 29- FUDGE, A.M.
Laboratory medicin, avian and exotic pets.
W.B.Sanders Company, 2000, p355, 358-362.

- 30- FUENTEALBA, I.C., MAHONEY, N.T., SHADDUCK, J.A. *et al.*
Hepatic lesions in rabbits infected with *E. cuniculi* administered per rectum.
Vet Pathol, 1992, **29**, 536-540.
- 31- FURUYA, K., FUKUI, D., YAMAGUCHI, M. *et al.*
Isolation of *Encephalitozoon cuniculi* using primary tissue culture techniques from a rabbit in a colony showing encephalitozoonosis.
J. Vet. Sci., Feb 2001 ; **63**(2), 203-206.
- 32- CORCORAN, G.D., ISAACSON, J.R., DANIELS, C., *et al.*
Urethritis associated with disseminated microsporidiosis: clinical response to albendazole.
Clin Inf Dis, 1996, **22**, 592-593.
- 33- GUNNARSON, G., HURLBUT, D., DEGIROLAMI, P.C, *et al.*
Multiorgan microsporidiosis: report of five cases and review.
Clin Inf Dis, 1995, **21**, 37-44.
- 34- HILLIER, E.V., QUESENBERRY, K.E.
Ferrets, rabbits and rodents, clinical medicine and surgery.
W.B.Sanders Company, 2000, p209, 220-222, p342.
- 35- HOLLISTER, W.S., CANNING, E.U., VINEY M.
Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in stray dogs as determined by an ELISA.
Veterinary Record, 1989, **124**, 332-336
- 36- HUNTER, P.R.
Waterborne outbreak of microsporidiosis.
J Inf Dis, 2000, **182**(1), 380-381.
- 37- HUTIN, Y.J., SOMBARDIER, M.N., LIGUORY, O. *et al.*
Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection= a case control study.
J Inf Dis, sep 1998, **178**(3), 904-907.
- 38- ILLANES, O.G., TIFFANI-CASTIGLIONI,, EDWARDS, J.F. *et al.*
Spontaneous encephalitozoonosis in an experimental group of guinea pigs.
J Vet Diagn Invest, 1993, **5**, 649-651.
- 39- KATINKA, M.D. *et al.*
Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*.
Nature, nov 2001, **415**.
- 40- KHAN, I.A., MORETTO, M., WEISS, L.M.
Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection.
Microbes and Infection, 2001, **3**, 401-405.

- 41- KRAFT, V., BLANCHET, H.M., BOOT, R. *et al.*
Recommandations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies.
Lab Anim, 1994, **28**, 1-12.
- 42- LARSON, J.I.R.
Identification of Microsporidia.
Acta Protozool, 1999, 38, 161-197.
- 43- LECUIT, M., OKSENHENDLER, E., SARFATI, C.
Use of albendazole for disseminated microsporidian infection in a patient with AIDS.
Clin Inf Dis, 1994, **19**, 332-333.
- 44- LEIRO, J., IGLESIAS, R., PANAMA, A. *et al.*
PCR détection of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) musculature.
Parasitology, 2002, **124**, 145-151.
- 45- LOPEZ-VELEZ, R., TURRIENTES, M.C., GARRON, C. *et al.*
Microsporidiosis in travellers with diarrhea from the tropics.
J Travel Med, 1999, **6**, 223-227.
- 46- LORES, B., LOPEZ-MIRAGAYA, I., ARIAS, C., *et al.*
Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain.
Clin Inf Dis, 2002, **34**, 918-921.
- 47- MATHIS, A., TANNER, I., WEBER, R., DEPLAZES, P.
Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidien *E.hellem*.
Int J Parasitol, 1999, **29**, 767-770.
- 48- MOLINA, J.M., SARFATI, C., BEAUVAIS, B. *et al.*
Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features.
J Inf Dis, 1993, **167**, 217-221.
- 49- MÜLLER, C.
Untersuchung zur Diagnostik, Biologie und Verbreitung von Microsporidien bei Kaninchen und anderen Tierarten. [Etude du diagnostic, de la biologie des Microsporidies chez le lapin et autres espèces animales.]
Thèse de doctorat vétérinaire, Zürich, 1998.
- 50- NAST, R., MIDDLETON, D.M., WHEELER, C.L.
Generalised encephalitozoonosis in a Jersey wooly rabbit.
Can Vet J, mai 1996, **37**(5), 303-305.

- 51- NOVILLA, M.N., KWASPIEN, R.P.
Microsporidian infection in the Pied Peach-Faced lovebird (*Agapomis rosecollis*).
Avian Dis, 1978, **22**(1), 198-204.
- 52- ONU-SIDA
Le point sur l'épidémie de Sida, décembre 2002.
Rapport en version française consulté sur le site de l'Un aids.
Web: (http://www.unaids.org/worldaidsday/2002/press/update/epiupdate2002_fr.doc)
- 53- POONACHA, K.B., WILLIAM, P.D., STAMPER, R.D.
Encephalitozoonosis in a parrot.
JAVMA, 1985, **186**(7), 700-702.
- 54- POURRUT, X., SARFATI, C., LIGNORY, O. *et al.*
Search for *E.bieneusi* infection in wild monkeys in Cameroon.
Trans R Soc Trop Med Hyg 2002, **96**(1), 56-57.
- 55- PRESCOTT, HARLEY, KLEIN.
La diversité du monde microbien, embranchement des Microspora.
In: Microbiologie. De Boeck Univ Ed., 1995, 556-557.
- 56- RANDALL, C.J., LEES, S., HIGGINS, R.J., *et al.*
Microsporidian infection in lovebirds (*Agapornis* spp.).
Avian Pathology, 1986, **15**, 223-231.
- 57- ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K.
Techniques immunologiques.
In: Immunologie, chap. 25, 1-16.
De Boeck Université, 3^e édition, 1994.
- 58- SCAGLIA, M., GATTI, S., SACCHI, L., *et al.*
Asymptomatic respiratory tract microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in three patients with AIDS.
Clin Inf Dis, 1998, **26**, 174-176.
- 59- SCOTTELIUS, J., SCHMETZ, C., KOCK, NP. *et al.*
Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus Encephalitozoon.
Microbes and Infection, 2000, **2**, 1401-1406.
- 60- SNOWDEN K.F., DIDIER, E.S, ORENSTEIN, J.M., SHADDUCK J.A.
Animal models of human microsporidial infections.
Lab. Anim. Sci., Déc1998, 48(6), 589-592.
- 61- SNOWDEN, K., LOGAN, K.
Molecular identification of *E. hellem* in an ostrich.
Avian Dis, 1999, **43**, 779-782.

- 62- SNOWDEN, K., LOGAN, K., DIDIER, E.S.
Encephalitozoon cuniculi strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs.
J Inf Dis, Déc 1999, **180**(6), 2086-2088.
- 63- SPARFEL, J.M., AUGET, J.L., MIEGEVILLE, M.:
Optimisation du diagnostic parasitologique des microsporidioses intestinales humaines.
Page du site internet de l'Institut Pasteur, consultée le 10/08/02.
Web: (<http://www.pasteur.fr/sante/socpatex/pdf/1998n2/Sparfel.pdf>)
- 64- SUTER, C., MATHIS, A., HOOP, R., DESPLAZES, P.
Encephalitozoon hellem infection in a yellow-streaked lorry (*Chalcopsitta scintillata*) imported from Indonesia.
Vet Rec, 1998, **143**, 694-695.
- 65- THOMAS, C., FINN, M., TWIGG, L. *et al.*
Microsporidia (*E. cuniculi*) in wild rabbits in Australia.
Aust Vet J, 1997, **75**(11), 808-810.
- 66- TOSONI, A., NEBULORUI, M., FERRI, A., *et al.*
Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (Dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study.
Mod Pathol, 2002, **15**(5), 577-583.
- 67- TZIPORI, S., CARVILLE, A., WIDMER, G. *et al.*
Transmission and establishment of a persistent infection of *E. bienersi* derived from a human with AIDS, in Simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys.
J Inf Dis, 1997, **175**, 1016-1020.
- 68- VAN GOOL, T., DANKERT, J.
Human microsporidiosis: clinical, diagnostic and therapeutic aspects of an increasing infection.
Clin Microbiol Infect, 1995, **1**(2), 75-85.
- 69- VAN GOOL, T., SNUDERS, F., REISS, P. *et al.*
Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidia infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique.
J Clin Pathol, 1993, **46**, 694-699.
- 70- VAN GOOL, T., VETTER, J.C.M., WEINMAYR, B., *et al.*
High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects.
JID, April 1997, **175**, 1020-1024.
- 71- WASSON, K., PEPER, R.L.
Mammalian microsporidiosis.
Vet Pathol, 2000, **37**, 113-128

72- WASSON, K., SNOWDEN, K., DIDIER, E. *et al.*

Rabbit intestinal xenograft model for human *Encephalitozoon* infections in mice.
Lab Anim Sci, 1999, **49**, 189-196.

73- WEBER, R., BRYAN, R.T., OVEN, R. *et al.*

Improved light microscopical detection of microsporidia spore in stool and duodenal aspirate.
New Eng J Med, 1992, **326**, 161-166.

74- WEBER, R., BRYAN, RT., SCHWARTZ, DA., OWEN, RL.

Human microsporidial infections.
Clin Microbiol Rev, oct 1997, **7**(4): 426-61.

75- WEBER, R., SAUER, B., SPYCHER, M.A. *et al.*

Detection of *Septata intestinalis* in stool specimens and coprodiagnostic monitoring of successful treatment with albendazole.
Clin Inf Dis, 1994, **19**, 342-345.

76- ZULU, I., VEITCH, A., SIANONGO, S. *et al.*

Albendazole chemotherapy for AIDS-related diarrhea in Zambia; clinical, parasitological and mucosal responses.
Aliment Pharmacol Ther, mar 2002, **16**(3), 595-601.