

**MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu devant le Jury interrégional**

**Le 24 avril 2006**

**Par Mlle ESPERN Anne**

Conformément aux dispositions de l'arrêté  
du 23 mars 2003 tient lieu de :

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

**Prévalences et études génotypiques des  
microsporidioses intestinales dans trois  
zones géographiques distinctes  
(Vietnam, Niger et France)**

Président : Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT  
Membres : Monsieur le Professeur François RAFFI  
Madame le Docteur Françoise GAY-ANDRIEU  
Monsieur le Docteur Michel MIEGEVILLE (Directeur de thèse)

## TABLE DES FIGURES

<b>FIGURE 1. CLASSIFICATION DES MICROSPORIDIES INFECTANT L'HOMME, CANNING 1989.....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURE 2. L'ARBRE DES EUCARYOTES, MONTRANT DES VARIATIONS DANS LA TAILLE DES GÉNOMES. IL Y A CINQ HYPOTHÉTIQUES SUPER GROUPES : EXCAVATES (E), UNIKONTS (U), PLANTS (P), CHROMALVEOLATES (C) AND RHIZARIA (R). LES MICROSPORIDIES SONT TRÈS PROCHE DES ZYGOMYCÈTES (KEELING AND SLAMOVITS 2005).....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURE 3. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT DES MICROSPORIDIES. L'ULTRASTRUCTURE DES STADES MÉRONTES ET SPORONTE VARIE SELON LES DIFFÉRENTS GENRES DE MICROSPORIDIES. (FRANZEN AND MULLER 1999).....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURE 4. ORGANISATION TYPIQUE DE LA SPORE MICROSPORIDIENNE. LA CONFIGURATION DU FILAMENT POLAIRE VARIE SELON L'ESPÈCE DE MICROSPORIDIES (FRANZEN AND MULLER 1999).....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURE 5. STADE JEUNE D'ENTEROCYTOZON BIENEUSI. IL CONTIENT UN SEUL NOYAU, MESURE DE 3À 4 MM DE DIAMÈTRE. A SA PÉRIPHÉRIE, LES MITOCHONDRIES DE L'ENTÉROCYTE ET UNE ENCLAVE LIPIDIQUE (L). MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (DESPORTES-LIVAGE AND DATRY 2005).....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURE 6 MÉCANISME D'INFECTION D'UNE CELLULE PAR UNE D'UNE SPORE DE MICROSPORIDIE : (A) INVASION ACTIVE. (B) PROCESSUS PHAGOCYTAIRE (FRANZEN 2004).....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURE 7 DÉCHARGE DE LA SPORE DANS LA CELLULE HÔTE (MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE).(DESPORTES-LIVAGE AND DATRY 2005).....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURE 8. DÉVELOPPEMENT D'ENTEROCYTOZON BIENEUSI DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURE 9. DÉVELOPPEMENT D'ENCEPHALITOOZON INTESTINALIS DANS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL. ....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURE 10. PARASITES OPPORTUNISTES INTESTINAUX DÉTECTÉS CHEZ LES PATIENTS INFECTÉS PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE 1993 À 2001À LA PITIÉ SALPÊTRIÈRE. LA CHUTE DU NOMBRE DE CAS EN 1994 ET EN 1996 EST L'EFFET DES TRAITEMENTS PAR LA BITHÉRAPIE, PUIS PAR LA TRITHÉRAPIE ANTIRÉTROVIRALE HAUTEMENT ACTIVE.(DESPORTES-LIVAGE AND DATRY 2005).....</b>	<b>36</b>

<b><u>FIGURE 11. SPORE DE E. BIENEUSI EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE X1000. LES FLÈCHES INDIQUENT L'ENROULEMENT DOUBLE DU TUBE POLAIRE CARACTÉRISTIQUE DE L'ESPÈCE (CENTER FOR DISEASE CONTROL 2005).....</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>FIGURE 12. SPORES D' E. BIENEUSI DANS LES SELLES D'UN PATIENT INFECTÉ PAR LE VIH. COLORATION AU TRICHOME MODIFIÉ (OBJECTIF X100). LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE, CHU NANTES.....</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>FIGURE 13. SPORES D' E. BIENEUSI, COLORATION À L'UVITEX 2B, MICROSCOPE À FLUORESCENCE, OBJECTIF X100, FILTRE 365NM (FRANZEN AND MULLER 2001).....</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>FIGURE 14. STRUCTURE DES PRINCIPALES MOLÉCULES UTILISÉES EN THÉRAPEUTIQUE.....</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b><u>FIGURE 15. LABORATOIRE : INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE ET D'ÉPIDÉMIOLOGIE, HANOÏ, VIETNAM.....</u></b>	<b><u>62</u></b>
<b><u>FIGURE 16 PRINCIPE DE LA PCR TEMPS RÉEL BASÉE SUR LA TECHNOLOGIE TAQMAN. LA SONDE MARQUÉE DE PART ET D'AUTRE PAR UN REPORTER ET UN QUENCHER EST CLIVÉE PAR L'ADN POLYMÉRASE LORS DE L'ÉLONGATION. L'ÉLOIGNEMENT DES DEUX FLUOROCHROMES PROVOQUE UNE ÉMISSION DE FLUORESCENCES.....</u></b>	<b><u>66</u></b>
<b><u>FIGURE 17. REPRÉSENTATION DES MÉCANISMES DE CHAUFFAGE/REFROIDISSEMENT DE L'ENCEINTE. DURANT LE REFROIDISSEMENT, LES ÉCHANTILLONS SONT SOUMIS À UNE ROTATION (500 À 1000 RPM) AFIN DE FACILITER LES TRANSFERTS THERMIQUES.....</u></b>	<b><u>66</u></b>
<b><u>FIGURE 18. VUE DU DESSUS DE LA CHAMBRE DE CHAUFFAGE/REFROIDISSEMENT. LE ROTOR TOURNE DANS LE SENS DE LA FLÈCHE. LA POSITION DES CANAUX D'ÉMISSION ET DE DÉTECTION EST ÉGALEMENT REPRÉSENTÉE.....</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b><u>FIGURE 19 VUE DE PROFIL DU ROTOR MONTRANT LA POSITION D'UN TUBE TÉMOIN, DE L'INCIDENCE DE LA SOURCE D'ÉMISSION ET LA POSITION DU FILTRE DE DÉTECTION DE 6 CANAUX AU-DESSUS DU DÉTECTEUR DE FLUORESCENCE.....</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b><u>FIGURE 20. CINÉTIQUE DE LA PCR TEMPS RÉEL.....</u></b>	<b><u>68</u></b>
<b><u>FIGURE 21. PCR TEMPS RÉEL : COURBE D'AMPLIFICATION DU CONTRÔLE INTERNE (IPC), AJOUTÉ À CHAQUE ÉCHANTILLON.DE LA PCR.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b><u>FIGURE 22. REPRÉSENTATION SHÉMATIQUE DE SÉQUENCE D'ADN D'ENTEROCYTOZOON BIENEUSI AMPLIFIÉE PAR LE COUPLE PRIMER MSP3/MSP4B.....</u></b>	<b><u>74</u></b>

<b><u>FIGURE 23. GEL DE POLYACRYLAMIDE 9% PRODUITS DE PCR AMPLIFIÉ PAR DES PRIMERS MSP3/MSP4B SUR TROIS ÉCHANTILLONS DE NOTRE ÉTUDE (H166, H173, H213 ET N9). MV : MARQUEUR V ROCHE®</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>FIGURE 24 EXEMPLE DE CHROMATOGRAMME</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>FIGURE 25. PROTOCOLE D'ÉTUDE DES ÉCHANTILLONS DE SELLES DE PATIENTS RÉCOLTÉES AU NIGER, VIETNAM ET FRANCE</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b><u>FIGURE 26 RÉACTION D'AMPLIFICATION DES DIFFÉRENTES DILUTIONS DE LA GAMME DU TÉMOIN POSITIF E. BIENEUSI ET COURBE ÉTALON PERMETTANT DE CALCULER LE COEFFICIENT DE CORRÉLATION LINÉAIRE (R=0,99) ET LE RENDEMENT (R=92%)</u></b>	<b><u>82</u></b>
<b><u>FIGURE 27 RÉACTION D'AMPLIFICATION DES DIFFÉRENTES DILUTIONS DE LA GAMME DU TÉMOIN POSITIF E. INTESTINALIS ET COURBE ÉTALON PERMETTANT DE CALCULER LE COEFFICIENT DE CORRÉLATION LINÉAIRE (R=0,99), LE RENDEMENT (R=103%)</u></b>	<b><u>82</u></b>
<b><u>FIGURE 28. SPÉCIFICITÉ DE LA PCR TEMPS RÉEL DANS LE DIAGNOSTIC DE MICROSPORIDIOSIS INTESTINALES (GEL DE POLYACRYLAMIDE 9%)</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>FIGURE 29. REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE LA RÉPARTITION DES ÂGES DE LA POPULATION ÉTUDIÉE AU VIETNAM</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b><u>FIGURE 30 REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DU STATUT IMMUNITAIRE DE LA POPULATION ÉTUDIÉE AU VIETNAM</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b><u>FIGURE 31 REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE LA RÉPARTITION DE LA POPULATION ÉTUDIÉE EN FONCTION DES DIFFÉRENTS HÔPITAUX</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>FIGURE 32 RÉPARTITION GRAPHIQUE DE LA PRÉSENCE OU NON DE DIARRHÉES DANS LA POPULATION ÉTUDIÉE (N=170)</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b><u>FIGURE 33 REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS GÉNOTYPES RETROUVÉS AU VIETNAM, NIGER ET FRANCE</u></b>	<b><u>102</u></b>
<b><u>FIGURE 34 ARBRE PHYLOGÉNIQUE DES DIFFÉRENTES SÉQUENCES ÉTUDIÉES, À LA FOIS AU VIETNAM, NIGER ET FRANCE ( <a href="http://www.genebee.msu.su/index.html">HTTP://WWW.GENEBEE.MSU.SU/INDEX.HTML</a>)</u></b>	<b><u>102</u></b>
<b><u>FIGURE 35 PRÉSENCE DES PORCS EN LIBERTÉ AUX ALENTOURS DES HABITATIONS. VIETNAM</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>FIGURE 36. MARQUEUR DE POIDS MOLÉCULAIRE V DE 8 À 587 PB. ROCHE®</u></b>	<b><u>125</u></b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b><u>TABLEAU I. RÉVISION DE LA CLASSIFICATION DES MICROSPORIDIES INFECTANT L'HOMME, PROPOSÉE PAR SPRAGUE ET AL. EN 1992 (SPRAGUE, BECNEL ET AL. 1992).....</u></b>	<b>15</b>
---	-----------

<b><u>TABLEAU II. PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES MICROSPORIDIES INFECTANT L'HOMME (DESPORTES-LIVAGE 2000; FRANZEN AND MULLER 2001).....</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>TABLEAU III. ESPÈCES DE MICROSPORIDIES INFECTANT L'HOMME. (MATHIS, WEBER ET AL. 2005).....</u></b>	<b><u>31</u></b>
<b><u>TABLEAU IV. CARACTÉRISTIQUES COMPARÉES DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DIAGNOSTIQUES DES MICROSPORIDIOSES HUMAINES (BETTENS, GIGI ET AL. 1999).....</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b><u>TABLEAU V. ESPÈCES INFECTANT L'HOMME ET LES TRAITEMENTS RECOMMANDÉS (KOTLER AND ORENSTEIN 1998; DESPORTES-LIVAGE 2000; WEBER, DEPLAZES ET AL. 2000; DIDIER, MADDRY ET AL. 2005).....</u></b>	<b><u>56</u></b>
<b><u>TABLEAU VI. PROPRIÉTÉS SPECTRALES DU FAM ET DU TAMRA.....</u></b>	<b><u>65</u></b>
<b><u>TABLEAU VII. PCR TEMPS RÉEL E. BIENEUSI : CARACTÉRISTIQUES DES AMORCES ET SONDE.....</u></b>	<b><u>70</u></b>
<b><u>TABLEAU VIII. PCR TEMPS RÉEL E. INTESTINALIS : CARACTÉRISTIQUES DES AMORCES ET SONDE.....</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b><u>TABLEAU IX. GÉNOTYPAGE DES ÉCHANTILLONS POSITIFS À E. BIENEUSI : CARACTÉRISTIQUES DES AMORCES .....</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b><u>TABLEAU X. RÉSULTATS DE L'OPTIMISATION DES CONDITIONS DE LA PCR EN TEMPS RÉEL, CONCENTRATION EN MGCL2.....</u></b>	<b><u>80</u></b>
<b><u>TABLEAU XI RÉSULTATS DE L'OPTIMISATION DE LA PCR TEMPS RÉEL EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE D'ÉLONGATION HYBRIDATION.....</u></b>	<b><u>81</u></b>
<b><u>TABLEAU XII. ESSAI DE RÉPÉTABILITÉ POUR LA PCR TEMPS RÉEL E. BIENEUSI.....</u></b>	<b><u>84</u></b>
<b><u>TABLEAU XIII. RÉPÉTABILITÉ DE LA PCR E. BIENEUSI : MOYENNES, VARIANCES, ÉCARTS TYPES ET COEFFICIENTS DE VARIATION.....</u></b>	<b><u>84</u></b>
<b><u>TABLEAU XIV. ESSAI DE RÉPÉTABILITÉ POUR LA PCR E. INTESTINALIS.....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>TABLEAU XV. RÉPÉTABILITÉ DE LA PCR E. INTESTINALIS : MOYENNES, VARIANCES, ÉCARTS TYPES ET COEFFICIENTS DE VARIATION.....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>TABLEAU XVI ESSAI DE REPRODUCTIBILITÉ POUR LA PCR E. BIENEUSI.....</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>TABLEAU XVII ESSAI DE RÉPÉTABILITÉ POUR LA PCR E. INTESTINALIS.....</u></b>	<b><u>86</u></b>

<b><u>TABLEAU XVIII. CARACTÉRISTIQUES DES PATIENTS ATTEINTS DE MICROSPORIDIOSES INTESTINALES AU VIETNAM (E. B = E. BIENEUSI, E. I= E. INTESTINALIS).</u></b>	<b><u>90</u></b>
<b><u>TABLEAU XIX REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DE LA RÉPARTITION DES ÂGES DE LA POPULATION ÉTUDIÉE (N=226).</u></b>	<b><u>91</u></b>
<b><u>TABLEAU XX : CARACTÉRISTIQUES DU TAUX DE CD4 DANS LA POPULATION ÉTUDIÉE (N=225).</u></b>	<b><u>91</u></b>
<b><u>TABLEAU XXI RÉPARTITION DES CAS DE MICROSPORIDIOSES INTESTINALES COMPARÉES À LA MICROSCOPIE OPTIQUE. (*UN ÉCHANTILLON ÉTAIT EN QUANTITÉ INSUFFISANTE ET UN ÉTAIT ABSENT POUR LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE, D'OÙ N=15) .</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b><u>TABLEAU XXII RÉPARTITION DU NOMBRE DE PCR POSITIVES À E. BIENEUSI EN FONCTION DU TAUX DE CD4.</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b><u>TABLEAU XXIII FACTEURS DE RISQUE POUVANT ÊTRE ASSOCIÉS À LA PRÉSENCE DE MICROSPORIDIOSES INTESTINALES (TEST DU CHI2 À 5%) NS ::NON SIGNIFICATIF.</u></b>	<b><u>94</u></b>
<b><u>TABLEAU XXIV CARACTÉRISTIQUES DES PATIENTS ATTEINTS DE MICROSPORIDIOSES INTESTINALES EN FRANCE.</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b><u>TABLEAU XXV RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS POSITIFS EN PCR TEMPS RÉEL E. BIENEUSI.</u></b>	<b><u>97</u></b>

***INTRODUCTION***

Les microsporidies sont des eucaryotes unicellulaires, intracellulaires obligatoires, extrêmement répandus dans le règne animal.

C'est avec le SIDA qu'émergent des infections microsporidiennes causées par des espèces alors inconnues, notamment *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis*, pathogènes opportunistes responsables de microsporidioses intestinales.

De nombreuses inconnues persistent encore, relatives à l'épidémiologie, l'origine et le mode de transmission d'*Enterocytozoon bienewisi*. Les spores sont-elles présentes de façon ubiquitaire dans la nature ? La transmission peut-elle être inter-humaine ou zoonotique ?

L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence des microsporidioses intestinales chez des patients immunodéprimés, en particulier séropositifs pour le VIH, dans différentes zones géographiques. Dans la seconde partie, une analyse des séquences génomiques de la région ITS de l'ADN ribosomal pourrait nous permettre de montrer une prédominance de certaines souches en fonction des différentes zones géographiques, pouvant expliquer les modes de transmission des microsporidies.

*Partie I*

*Généralités*

## I. Historique

Les microsporidies sont des eucaryotes unicellulaires, parasites intracellulaires obligatoires, responsables chez l'hôte de pathologies appelées microsporidioses.

Au milieu du XIXe siècle, elles furent la cause d'épizootie qui contribua à leur découverte. La plus importante, en raison de ces conséquences économiques sur l'industrie de la soie en Europe, fut la maladie du ver à soie ou Pédrine. L'agent étiologique de cette maladie, *Nosema bombycis*, observé pour la première fois par Nägeli en 1857, se développe dans l'intestin de la larve du ver à soie, puis se dissémine dans tous les organes, rendant la larve incapable de tisser son cocon.

En 1882, Balbani proposa le terme de microsporidies (*Microsporidium*), pour désigner les parasites de type *Nosema*, en raison de la taille réduite des spores qui assurent leur dissémination : les microsporidies sont « des organismes caractérisés par la petitesse de leurs spores comparées à celle des autres sporozoaires ».

Les microsporidies constituent aujourd'hui un groupe de parasites retrouvé chez divers animaux vertébrés (poissons, oiseaux, mammifères) et invertébrés à sang froid (mollusques, arthropodes, nématodes, annélides, cnidaires). Bien que très répandus dans tout le règne animal, ces parasites sont surtout prépondérants chez les arthropodes, en particulier les insectes, et chez les poissons.

Quant aux mammifères, la première infection causée par les microsporidies fut observée en 1922 chez des lapins atteints de paralysie. L'examen du cerveau, de la moelle épinière et des reins révéla la présence d'un grand nombre de spores microsporidiennes, identifiées comme appartenant à une nouvelle espèce (*Encephalitozoon cuniculi*). Chez l'homme, le premier cas documenté d'infection microsporidienne fut décrit en 1959 chez un garçon âgé de 9 ans souffrant de fièvre, de vomissements, de maux de tête et perte de connaissance (Matsubayashi, Koike *et al.* 1959). Des spores ont été retrouvées dans les urines et le liquide cérébro-spinal. Ce cas est considéré comme le premier constat bien documenté.

Avant les années 1980, les microsporidioses sont rarement décrites chez l'homme et considérées comme des parasitoses accidentelles, le plus souvent consécutives à un déficit immunitaire transitoire ou irréversible du patient. Au début des années 1980, le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a eu pour conséquence un

accroissement du nombre de cas de microsporidioses humaines et la découverte d'espèces jusqu'alors inconnues.

En 1985, Desportes et *al.* observèrent pour la première fois la présence de microsporidies chez un patient atteint du SIDA présentant une diarrhée chronique (microsporidiose intestinale). Les caractéristiques de ce parasite ont permis de créer un nouveau genre et une nouvelle espèce : *Enterocytozoon bieneusi* (*E. b*) (Desportes 1985; Modigliani, Bories *et al.* 1985). Depuis, 9 nouvelles espèces ont été décrites chez des patients atteints du SIDA (Franzen and Muller 2001) et plusieurs centaines de cas de microsporidioses ont été rapportées à travers le monde entier (Bryan and Schwartz 1999). Les microsporidies sont aujourd'hui considérées comme des pathogènes responsables d'infections opportunistes principalement chez des patients atteints de SIDA, mais aussi chez d'autres patients immunodéprimés, non infectés par le VIH, tel que les sujets sous immunosuppresseurs à la suite d'une transplantation d'organe (Rabodonirina, Bertocchi *et al.* 1996; Gumbo, Hobbs *et al.* 1999; Metge, Van Nhieu *et al.* 2000). Plus récemment, quelques cas de diarrhées, dues à des microsporidies, ont été rapportés chez des sujets immunocompétents (Sandfort, Hannemann *et al.* 1994; Monneret, Rabodonirina *et al.* 1995; van Gool, Vetter *et al.* 1997; Desportes-Livage, Doumbo *et al.* 1998; Abreu-Acosta, Lorenzo-Morales *et al.* 2005). Au laboratoire de Parasitologie de Nantes, la première mise en évidence des spores de microsporidies dans les selles date de novembre 1992.

**Les microsporidies furent observées pour la première fois par Nägeli en 1857. Responsable de la pédrine dans les années 1850, elles ont causées des ravages économiques dans l'industrie du ver à soie. Les microsporidies sont largement répandues dans le règne animal. Plus d'un siècle plus tard, Desportes et *al.* ont mis en évidence le premier cas de microsporidiose intestinale humaine chez des patients atteints du virus du SIDA.**

## II. Organisme

### II.1. Caractéristiques

Plus de 1300 espèces de microsporidies ont été décrites selon Larsson (1999). Elles sont réparties entre 144 genres et constituent le phylum des Microspora.

Les microsporidies sont des parasites à spores unicellulaires, intracellulaires obligatoires, renfermant un sporoplasme (élément infectieux formé par le cytoplasme et un ou deux noyaux), avec un appareil d'extrusion plus ou moins complexe, pourvu d'un tube polaire permettant l'injection du sporoplasme dans la cellule hôte. On note également l'absence de flagelles, de gamètes morphologiquement différenciés. Les spores constituent la forme de résistance et de dissémination de ces parasites. Elles peuvent rester infectieuses pendant des mois.

Plusieurs particularités telles que l'absence de mitochondries, l'organisation atypique rudimentaire du Golgi, l'ARN ribosomal de type bactérien, la très petite taille du génome (2,3 Mpb chez *Encephalitozoon intestinalis*) suggèrent que les microsporidies seraient les eucaryotes les plus primitifs, situés à la base de l'arbre phylogénétique, évoquant presque les procaryotes (Mathis 2000). Les microsporidies sont aussi connues pour avoir le plus petit génome eucaryote (Keeling, Fast *et al.* 2005).

**Les microsporidies sont des eucaryotes, unicellulaires, intracellulaires obligatoires, dépourvues de mitochondries, et possèdent un génome de très petite taille.**

### II.2. Taxonomie

#### II.2.1. Classification

Du point de vue taxonomique, les microsporidies sont classées dans le Phylum des Microspora, proche des champignons, qui comporte actuellement 1300 espèces

(Desportes-Livage 2000). Chronologiquement, les différentes classifications des microsporidies ont beaucoup évolué depuis le début du siècle.

En 1857, Nagëli a classifié la première microsporidie, *Nosema bombycis*, dans le règne des Schizomycetes.

En 1882, Balbani définit l'ordre des Microsporidia.

Sprague et Vavra, en 1977 proposent une classification du Phylum Microspora (révisée en 1982) faisant intervenir l'ultra structure de la spore mais aussi son mode de formation. Cinq grands critères de classification sont alors retenus :

- la relation hôte-parasite
- la morphologie de l'appareil nucléaire
- le passage de la mérogonie à la sporogonie
- les différents types de division du plasmode sporogonique
- l'organisation sporale, la structure du polaroplaste, la morphologie du filament polaire.

La classification actuellement la plus utilisée est celle de Canning (1989). Les principales modifications apportées par rapport à celle de Sprague sont le passage de la famille des *Glugeidae* dans le sous ordre des Pansporoblastina, l'intégration dans cette famille du genre *Pleistophora*, le passage du genre *Encephalitozoon* de la famille des *Glugeidae* à celle des *Unikaryonidae* et la description de nouveaux genres. (Figure 1)

<u>Phylum</u>	Microspora, Sprague 1977
<u>Classe</u>	Microsporea, Delphy 1963
<u>Ordre</u>	Microsporidia, Balbani 1882
	Deux Sous-Ordres, Tuzet 1971
Pansporoblastina	Apansporoblastina
<u>Famille</u> <i>Glugeidae</i>	<u>Famille</u> <i>Unikaryonidae</i>
Genre <i>Pleistophora</i>	genre <i>Encephalitozoon</i>
Genre <i>Trachipleistophora</i>	genre <i>Enterocytozoon</i>

Famille *Nosematidae*Genre *Nosema***Figure 1. Classification des microsporidies infectant l'homme, Canning 1989.**

En 1992, Sprague *et al.* (Sprague, Becnel *et al.* 1992) ont publié une nouvelle classification basée essentiellement sur les différences observées lors de la division nucléaire. Le phylum des Microspora est divisé en deux classes, la classe des Dihaplophasea et celle des Halophasea, correspondant respectivement à la présence ou l'absence de gamètes haploïdes qui s'associeront par deux pour donner des cellules à dicaryon, les mérontes (Tableau 1).

PHYLUM : MICROSPORA			
Classe	Ordre	Famille	Genre
Dihaplophasea	Meiodihaplophasida	<i>(N'infectent pas l'Homme)</i>	
	Dissociodihaplophasida	Nosematidae	<i>Nosema</i> <i>Brachiola</i> <i>Vittaforma</i>
Haplophasea	Glugeida	Pleistophoridae	<i>Pleistophora</i> <i>Trachipleistophora</i>
		Encephalitozoonidae	<i>Encephalitozoon</i>
	Chytridiopsida	Enterocytozoonidae	<i>Enterocytozoon</i>
Non classé	Non classé	Non classé	<i>Microsporidium</i>

**Tableau I. Révision de la classification des microsporidies infectant l'homme, proposée par Sprague *et al.* en 1992 (Sprague, Becnel *et al.* 1992)**

Ces classifications basées uniquement sur l'ultrastructure ne suffisent plus à l'étude de l'évolution et des relations des différents genres ou espèces. La comparaison des séquences d'ADN ribosomal remet en question la place de certains genres et espèces et ouvre également de nouvelles perspectives sur la position des microsporidies dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes.

### II.2.2. Phylogénie

Ces organismes sont des eucaryotes qui présentent les caractères des procaryotes (organisation de l'acide ribonucléique ribosomal, taille réduite et compaction du génome, la taille des ribosomes (70S) et des sous unités ribosomales (50S+30S), la taille des ARNr (23S et 16S) mais aussi l'absence d'ARN 5.8S). L'absence de mitochondries typiques fit supposer que ces eucaryotes étaient apparus avant l'endosymbiose

mitochondriale. Cette proposition a été exclue depuis la découverte des gènes codant pour des protéines mitochondriales et la mise en évidence d'un chondriome vestigial. Cependant le séquençage du génome de *E. cuniculi* montra l'existence de gènes codant pour des fonctions mitochondriales, montrant que les microsporidies ont conservé des organites dérivés des mitochondries (Katinka, Duprat *et al.* 2001). Les microsporidies étudiées à l'heure actuelle possèdent des gènes codant pour une « heat-shock protein » de la classe des HSP70 (Germot, Philippe *et al.* 1997; Hirt, Healy *et al.* 1997). Les résultats indiquent une relation étroite avec les gènes codant pour HSP70 mitochondriale des levures (Germot, Philippe *et al.* 1997; Hirt, Healy *et al.* 1997). Elles partagent par ailleurs avec les champignons diverses particularités : l'insertion de 11 acides aminés dans la séquence de EF1, les modalités de division nucléaire, les stades diplocaryotiques, l'homologie des séquences de gènes codant pour certaines protéines, la présence de chitine et de tréhalose, l'organisation de certains gènes ( $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline), et une mitose fermée (Canning 1988; Muller 1997; Keeling, Deane *et al.* 1998; Vivares 1999; Keeling, Luker *et al.* 2000). Des analyses phylogénétiques avancées suggèrent que les microsporidies appartiendraient aux zygomycètes (Figure 2) (Cavalier-Smith 1998; Keeling 2003). Bien que la nature exacte des relations phylogénétiques entre les microsporidies et les champignons reste à clarifier, elles ne sont plus aujourd'hui considérées comme des eucaryotes primitifs, mais plutôt comme un groupe d'organismes très évolués et spécialisés, apparentés aux champignons (Muller 1997; Keeling and McFadden 1998; Keeling and Fast 2002; Keeling 2003)

La localisation des microsporidies parmi les champignons doit avoir des répercussions sur les nouvelles stratégies thérapeutiques. Le traitement pour l'espèce la plus importante, *E. bienewisi*, reste difficile (Molina, Tourneur *et al.* 2002; Gross 2003).

**Les microsporidies ne sont plus aujourd'hui considérées comme des eucaryotes primitifs, mais plutôt comme un groupe d'organismes très évolués et spécialisés, apparentés aux champignons.**

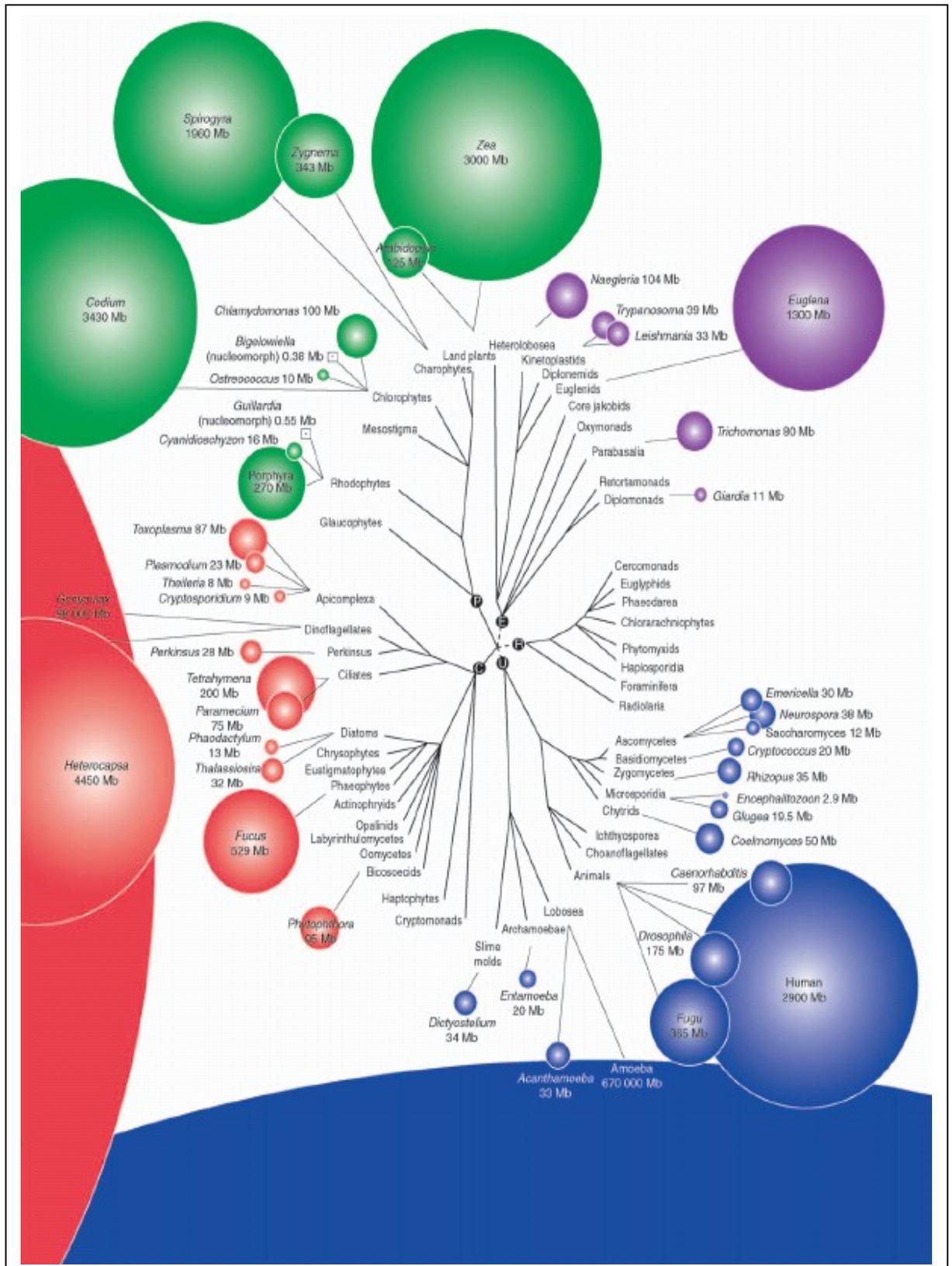


Figure 2. L'arbre des eucaryotes, montrant des variations dans la taille des génomes. Il y a cinq hypothétiques super groupes : **Excavates (E)**, **Unikonts (U)**, **Plants (P)**, **Chromalveolates (C)** and **Rhizaria (R)**. Les microsporidies sont très proche des zygomycètes (Keeling and Slamovits 2005)

### II.3.Cycle

Le développement des microsporidies comporte deux phases distinctes qui se succèdent à l'intérieur de la cellule hôte : une phase proliférative ou mérogonie qui donne naissance à des mérontes, suivie d'une phase de sporulation ou sporogonie, au cours de laquelle des sporontes produisent des sporoblastes, qui se différencient en spores (Desportes-Livage 2000; Bigliardi and Sacchi 2001). (Figure 3)

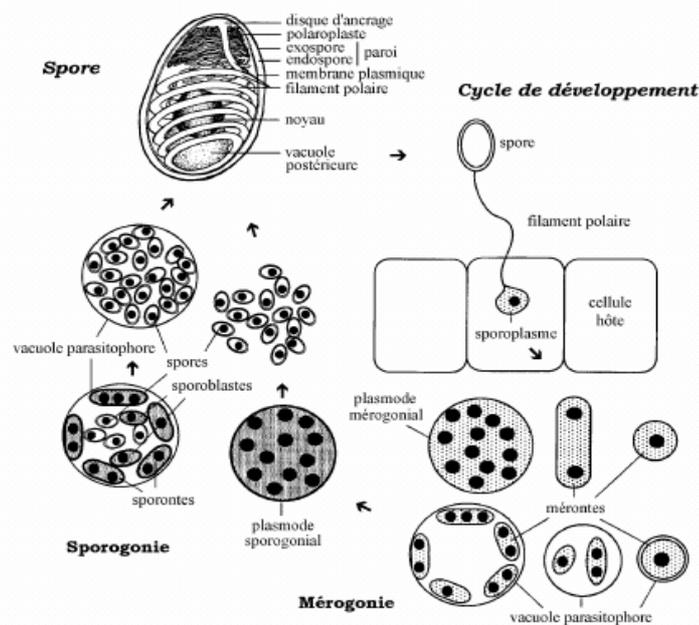


Figure 3. Cycle de développement des microsporidies. L'ultrastructure des stades mérontes et sporonte varie selon les différents genres de microsporidies. (Franzen and Muller 1999)

#### II.3.1.Spore

Unique stade extracellulaire, les spores (Figure 4 et 5) constituent la forme de développement la plus caractéristique des microsporidies. Sa morphologie (taille et forme) varie selon les espèces, mais aussi parfois au sein d'une même espèce. Ovoïdes, ellipsoïdes ou pyriformes chez la plupart des microsporidies, les spores peuvent aussi avoir l'aspect de baguettes ou de bâtonnets. Chez les espèces pathogènes pour l'homme, elles mesurent entre 1  $\mu\text{m}$  pour les plus petites (*Enterocytozoon bieneusi*) et 5  $\mu\text{m}$  pour les plus grandes (*Nosema ocularum*). (Tableau II)

En microscopie optique, les spores peuvent être identifiées grâce à diverses colorations telles que celles de Giemsa, Gram, trichrome modifié (Weber, Bryan *et al.* 1992), fluorochrome (van Gool, Snijders *et al.* 1993; Vavra, Dahbiova *et al.* 1993). La microscopie électronique à transmission permet d'observer trois parties : la paroi, l'appareil d'extrusion et le sporoplasme. L'organisation des spores est identique chez toutes les microsporidies.

Les spores sont des cellules hautement spécialisées, dont la membrane plasmique est entourée d'une endospore et d'une exospore formant une paroi rigide. L'exospore constitue la couche externe de la paroi et possède une structure très complexe de nature glycoprotéique (Bigliardi, Selmi *et al.* 1996; Bigliardi and Sacchi 2001). L'endospore, riche en chitine, est en contact direct avec la membrane plasmique des spores; son épaisseur est uniforme sur toute sa surface, excepté au niveau de l'apex. La membrane plasmique délimite le contenu des spores, à savoir le sporoplasme infectieux et l'appareil d'extrusion permettant l'infestation de la cellule hôte. L'appareil nucléaire est soit unique, soit formé de deux noyaux accolés formant un diplocaryon.

L'appareil d'extrusion est le plus remarquable, car il va assurer l'infestation de la cellule hôte. Le tube polaire, d'une longueur pouvant atteindre 20 à 50 fois celle de la spore, est enroulé selon plusieurs tours de spire. Suite à un stimulus, le tube polaire se dévagine; la vitesse de dévagination, *in vitro*, évaluée en vidéo microscopie, est égale à 105  $\mu\text{m}/\text{sec}$  (Frixione, Ruiz *et al.* 1992).

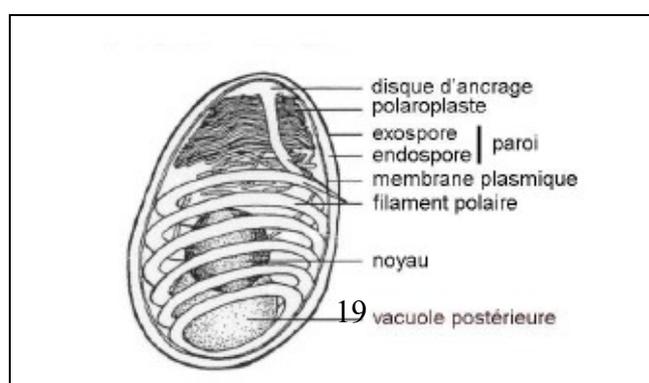


Figure 4. Organisation typique de la spore microsporidienne. La configuration du filament polaire varie selon l'espèce de microsporidies (Franzen and Muller 1999)

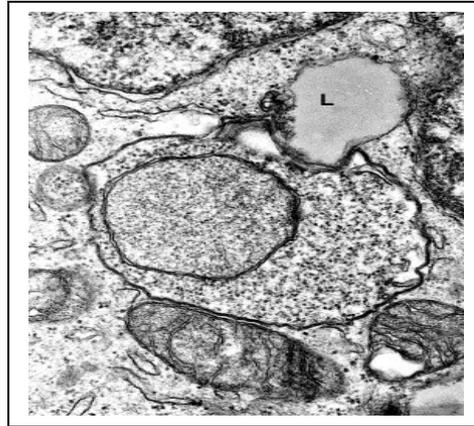


Figure 5. Stade jeune d'*Enterocytozoon bieneusi*. Il contient un seul noyau, mesure de 3 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre. A sa périphérie, les mitochondries de l'entérocyte et une enclave lipidique (L). Microscopie Electronique (Desportes-Livage and Detry 2005)

Les microsporidies constituent un groupe extrêmement diversifié. Leurs petites tailles et la forme de leurs spores infestantes sont caractéristiques. Elles sont pourvues d'un filament polaire et d'un noyau qui constituent le matériel infestant. L'exospore composée de chitine assure une très grande résistance à l'environnement.

Caractéristiques des spores	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	<i>Encephalitozoon spp.</i>	<i>Nosematidae</i>	<i>Vittaforma spp.</i>	<i>Pleitophora spp</i>	<i>Trachipleistophora spp.</i>
Taille (µm)	1,0-1,6 x 0,6-0,9	2,0 x 1,0-1,5	2,5-5,0 x 2,0-2,5	3,1-4,5 x 1,0-1,2	3,2-3,4 x 2,8	4 x 2,4
Nombre de spires	5 à 7	5 à 7	7 à 12	5 à 7	9 à 12	11
Arrangement du tube polaire	2 rangées	1 rangée	1 à 3 rangées	1 rangée	2 rangées	1 à 2 rangées
Noyau	unique	Unique	diplocaryotique	diplocaryotique	unique	unique
Vacuole	Aucune, directement au contact du cytoplasme de la cellule hôte	Présence, Formée par la cellule hôte	Aucune	Aucune	Présence d'une vacuole parasitophore	Présence d'une vacuole parasitophore
Aspects particuliers	Formation du tube polaire dès le stade sporonte		Sporogonie disporoblastique	Sporogonie tétrasporoblastique	Sporogonie multispores	Pas de sporogonie multispore

Tableau II. Principales caractéristiques des microsporidies infectant l'homme (Desportes-Livage 2000; Franzen and Muller 2001)

### II.3.2. Infestation

L'infestation d'une cellule hôte par les microsporidies est un phénomène qui reste encore assez mal caractérisé. Ce processus extrêmement rapide (moins de deux secondes *in vitro*) comprend l'activation de la spore puis la décharge du tube polaire permettant l'injection du sporoplasme infectieux à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte. La nature des stimuli provoquant l'activation puis la germination de la spore est très variable selon les espèces, reflétant sans doute l'adaptation des microsporidies à leur hôte et à leur environnement extérieur. *In vitro*, la germination des spores peut être induite par un très grand nombre de stimuli tels que : la présence de divers ions, des variations du pH du milieu extérieur, des conditions hyperosmotiques, une déshydratation suivie d'une réhydratation ou bien encore l'exposition aux ultraviolets. Quelque soit le stimulus impliqué, l'activation de la spore se traduit toujours par une augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de celle-ci, s'accompagnant d'un afflux d'eau qui a pour conséquence un gonflement du polaroplaste (Undeen and Frixione 1991) et de la vacuole postérieure. La structure complexe de la paroi de la spore fournit la résistance nécessaire pour permettre le maintien de la pression osmotique à un niveau élevé. Selon Undeen et *al.*, en 1999, l'augmentation de la pression osmotique au cours de l'activation de la spore est générée par la dégradation du tréhalose en monomère de glucose sous l'action de la tréhalase (Undeen and Vander Meer 1999). Une autre hypothèse suggère un rôle important des ions calcium  $Ca^{2+}$  ; la désorganisation des systèmes membranaires au cours de l'activation de la spore entraînerait la libération d'ions  $Ca^{2+}$  dans le sporoplasme, responsable d'un afflux d'eau et de l'augmentation de la pression osmotique (Keohane and Weiss 1998). Les ions  $Ca^{2+}$  pourraient également interagir avec les composants du cytosquelette de la spore et induire l'activation d'enzymes telles que la tréhalase. Le gonflement du polaroplaste entraîne la rupture du disque d'ancrage et déclenche l'émergence du filament polaire au niveau de l'apex de la spore, là où la paroi est la plus fine (Keeling and Fast 2002). Au cours de sa décharge, le tube polaire progresse à l'extérieur de la spore grâce à la polymérisation des protéines qui le constituent, et se réorganisent pour former un tube cylindrique creux. Le gonflement de la vacuole postérieure exerce une pression qui pousse le sporoplasme à l'intérieur du tube polaire. Le mécanisme par lequel le tube polaire pénètre à l'intérieur de la cellule hôte reste mal connu. Pendant très longtemps, il a été admis que la décharge du tube polaire

provoquait la rupture mécanique de la membrane plasmique de la cellule hôte, permettant l'injection du sporoplasme directement dans le cytoplasme de celle-ci (Figure 6 et 7). Des travaux récents suggèrent que la pénétration du tube polaire dans la cellule hôte pourrait mettre en jeu un processus phagocytaire particulier, apparemment induit par le parasite (Magaud, Achbarou *et al.* 1997; Foucault and Drancourt 2000; Bigliardi and Sacchi 2001; Franzen 2004).

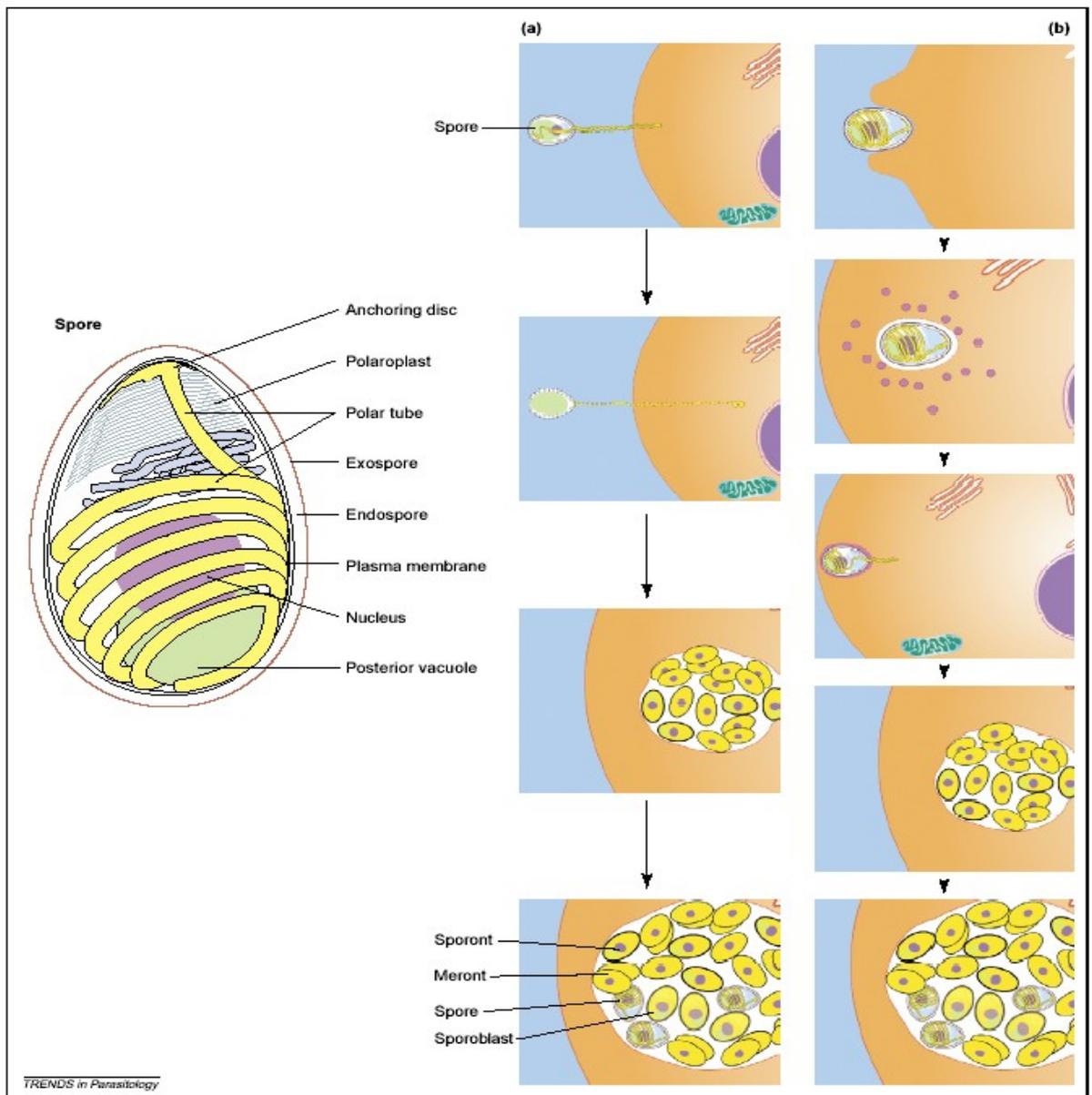


Figure 6 Mécanisme d'infection d'une cellule par une d'une spore de microsporidie : (a) invasion active. (b) Processus phagocytaire (Franzen 2004)

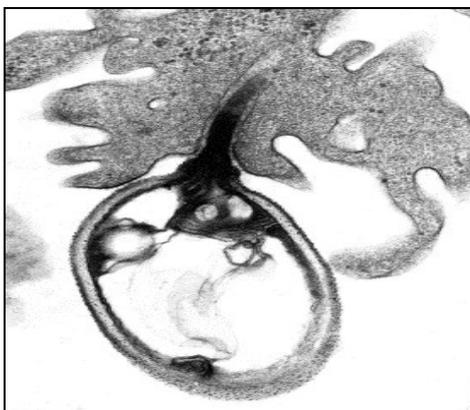


Figure 7 Décharge de la spore dans la cellule hôte (microscopie électronique). (Desportes-Livage and Datry 2005)

### II.3.3. Mérogonie

La phase proliférative ou mérogonie débute après l'inoculation du sporoplasme infectieux dans la cellule hôte. Les cellules en division, désignées par le terme de mérontes, sont entourées d'une membrane et possèdent un noyau simple ou sous la forme d'un diplocaryon. Leur cytoplasme est riche en ribosomes libres ou associés au réticulum endoplasmique. Les noyaux des mérontes subissent plusieurs divisions successives. Dans certains cas, la division du noyau est immédiatement suivie de celle du cytoplasme (*Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*). Dans d'autres cas, le cytoplasme ne se divise pas et les noyaux issus de plusieurs divisions demeurent groupés au sein d'un cytoplasme commun, aboutissant à la formation d'un plasmode mérogonial (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*). Selon les espèces, la mérogonie se déroule soit en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte (*Nosema*, *Enterocytozoon*), soit à l'intérieur d'une vacuole parasitophore formée à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte (*Encephalitozoon*) ou d'une couche amorphe sécrétée par le parasite (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*). Dans le cas du genre *Vittaforma*, le réticulum endoplasmique de la cellule hôte se réorganise pour entourer les mérontes en division.

### II.3.4. Sporogonie

La sporogonie constitue la séquence d'événements succédant à la mérogonie et aboutissant à la formation des spores, formes de résistance qui assurent la dissémination du parasite. Elle débute par la transformation des mérontes en sporontes, caractérisée

par le dépôt localisé d'un matériel opaque aux électrons à la surface de la membrane plasmique mais aussi par l'augmentation progressive du nombre de ribosomes dans le cytoplasme, le développement du réticulum endoplasmique et l'apparition de l'appareil de Golgi. Les sporontes se divisent pour donner naissance à des sporoblastes qui se différencient ensuite en spores. Chez certains genres (*Nosema*, *Encephalitozoon*, *Vittaforma*), la division du noyau du sporonte est liée à celle du cytoplasme et chaque sporonte donne naissance uniquement à deux sporoblastes. A l'inverse, lorsque la division du noyau ne s'accompagne pas de celle du cytoplasme, la multiplication des sporontes aboutit à la formation d'un plasmode sporogonial (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*). La maturation des sporoblastes en spores se traduit par la poursuite de l'épaississement de la membrane pour former une couche continue qui donnera naissance à l'exospore de la paroi. Le cytoplasme devient plus dense suite à la différenciation du réticulum endoplasmique lisse et rugueux et au développement de l'appareil de Golgi. L'appareil d'extrusion de la spore se met également en place lors de la maturation du sporoblaste. Le mode de formation des différents organites qui le composent reste encore assez flou; il semble que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi soient impliqués dans la formation du filament polaire, tandis que le polaroplaste et la vacuole postérieure auraient pour origine ces deux systèmes membranaires et/ou la membrane nucléaire (Bigliardi and Sacchi 2001). La condensation du matériel nucléaire, la formation de l'endospore et la polarisation des organites du sporoblaste constituent les étapes ultimes de la maturation en spore. (Figure 8 et 9)

**Le cycle des microsporidies comporte trois phase :**

- la phase d'infestation, extrusion du tube polaire et transit du sporoplasme infectieux dans le cellule
- Le phase de prolifération, mérogonie ou phase asexuée
- La phase de différenciation, sporogonie ou phase sexuée

**Les spores matures sont disséminées par l'éclatement de la cellule hôte, et contamination des cellules adjacentes.**

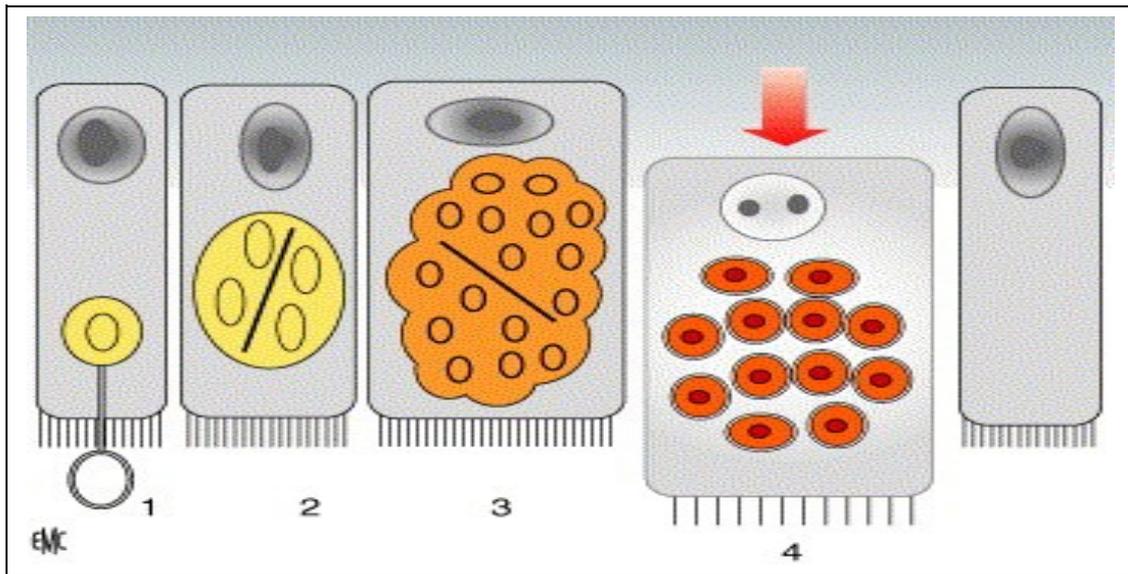
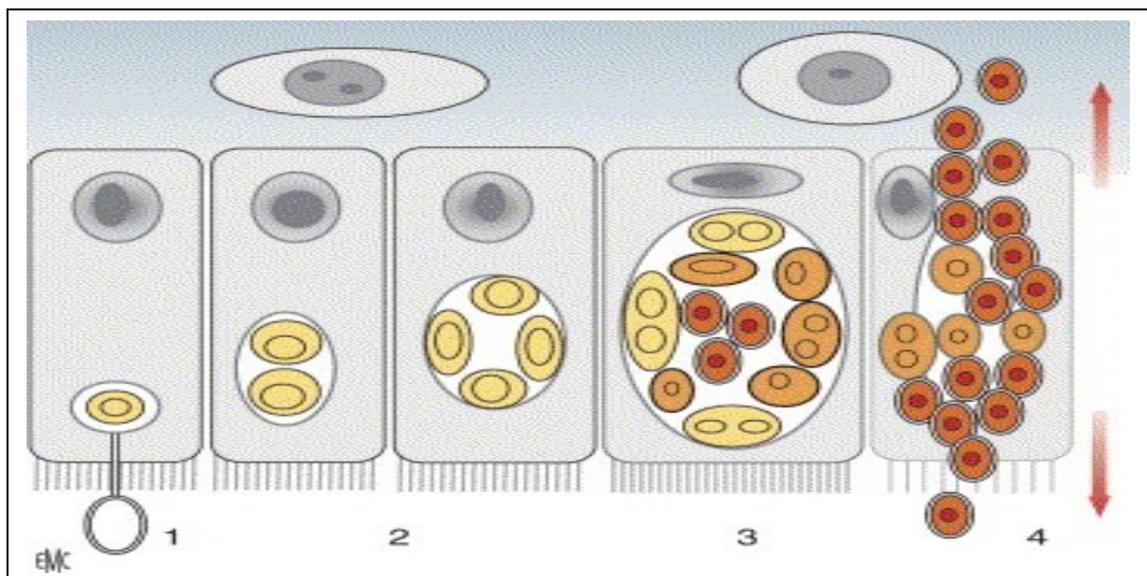


Figure 8. Développement d'*Enterocytozoon bieneusi* dans l'épithélium intestinal.

1. Le sporoplasme est injecté dans la cellule ; 2. Stade mérogonique à quatre noyaux ; 3. Sporontes avec de nombreux noyaux ; 4. Desquamation d'un entérocyte contenant les spores issues de la fragmentation du sporonte.



**Figure 9. Développement d'*Encephalitozoon intestinalis* dans l'épithélium intestinal.**

1. Injection du sporoplasme dans l'entérocyte ; 2. Vacuoles parasitophores contenant deux et quatre mérontes ; 3. vacuole parasitophore contenant tous les stades de développement ; 4. Les spores matures sont libérées dans la lumière intestinale et dans le chorion.

(Desportes-Livage and Datry 2005)

**III. Microsporidioses humaines**

Parmi les quelques 150 genres de microsporidies connus aujourd'hui, seuls 7 genres ainsi que quelques espèces non classifiées (désignées par le terme générique *Microsporidium*) ont été décrits comme pathogènes chez l'homme (Franzen and Muller 2001). Actuellement 15 espèces ont été reconnues comme pathogènes pour l'homme (Desportes 1985; Deplazes, Mathis *et al.* 2000; Didier, Stovall *et al.* 2004). La majorité des infections humaines est due aux deux genres, *Enterocytozoon* et *Encephalitozoon*, tandis que les autres genres (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Nosema*, *Vittaforma*, *Brachiola*) n'ont été observés que chez quelques patients. (Tableau III).

**III.1. Différents genres retrouvés chez les microsporidies****III.1.1. Genre *Nosema***

De nombreuses espèces de la famille des Nosematidae sont décrites chez les invertébrés et plus spécialement chez les insectes. Le développement du parasite se fait directement au contact du cytoplasme de la cellule hôte et tous les stades sont dicaryotiques. Une seule espèce, *Nosema ocularum*, responsable d'ulcérations de la cornée a été rapportée dans l'Ohio, chez un patient de 39 ans non immunodéprimé (Cali, Meisler *et al.* 1991; Cali, Meisler *et al.* 1991).

**III.1.2. Genre *Vittaforma***

En 1990, Davis *et al.* rapportent le cas d'un patient de 45 ans, infecté par culture *in vitro* à partir de biopsies de cornée du patient, décrit sous le nom de *Nosema corneum* (Shaddock, Meccoli *et al.* 1990) ; (Davis, Front *et al.* 1990). Contrairement aux espèces du même genre, tous les stades du cycle se déroulent dans une citerne du réticulum endoplasmique de la cellule hôte. S'appuyant sur l'étude ultrastructurale des différents stades de développement du parasite dans les cellules hépatiques de souris athymiques

infestées expérimentalement (Silveira and Canning 1995), un nouveau genre est créé et le nomme *Vittaforma corneae*.

### III.1.3.Genre *Brachiola*

Le genre *Brachiola* a été créé en 1998 par Cali *et al.* pour permettre la classification d'une nouvelle espèce de microsporidie, *Brachiola vesicularum*, mise en évidence dans les cellules musculaires d'un patient atteint de myosite et infecté par le VIH (Cali, Takvorian *et al.* 1998). Ce parasite se développe en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte et tous les stades de développement possèdent un ou deux noyaux présents, chacun sous la forme de diplocaryon. Deux autres espèces récemment reclassées dans le genre *Brachiola*, ont également été décrites chez l'homme. Il s'agit de *Brachiola connori* (*Nosema connori*) identifiée dans de nombreux organes et tissus chez un nourrisson athymique présentant une infection généralisée (Sprague 1974), et de *Brachiola algerae* (*Nosema algerae*), microsporidie parasite du moustique, responsable d'un cas de kératite récemment observé chez un patient immunocompétent (Visvesvara, Belloso *et al.* 1999; Lowman, Takvorian *et al.* 2000).

### III.1.4.Genre *Pleistiphora* et *Trachipleistophora*

Certaines espèces, décrites chez des poissons comme chez des diptères culicides présentent la particularité d'être entourées à tous les stades de leur développement par une épaisse paroi qui les isole du cytoplasme de la cellule hôte. Des analyses génomiques récentes des microsporidies classées dans le genre *Pleistophora* ont montré que les espèces parasites de diptères étaient différentes de celles des poissons. Il s'agit dans tout les cas de patients immunodéprimés et la comparaison des séquences d'ADN a montré que les microsporidies trouvées chez ceux-ci étaient très proches d'espèces parasites de diptères. (Cheney, Lafranchi-Tristem *et al.* 2000). *Trachipleistophora antropophthera* (Vavra, Yachnis *et al.* 1998) est la première espèce dimorphique de microsporidie décrite chez l'homme.

### III.1.5.Genre *Encephalitozoon*

Ce genre parasite les vertébrés terrestres et le développement s'effectue à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dans les cellules hôtes. Trois espèces appartenant au genre *Encephalitozoon* sont pathogènes pour l'homme : *Encephalitozoon cuniculi*,

*Encephalitozoon hellem* et *Encephalitozoon intestinalis*. *E. cuniculi* et *E. hellem* sont deux espèces morphologiquement identiques en microscopie optique et électronique; seules leurs propriétés antigéniques, biochimiques ou l'analyse moléculaire permettent de les différencier.

*Encephalitozoon hellem* fut isolée pour la première fois en 1991 à partir de la cornée de trois patients au stade SIDA souffrant de kératoconjonctivites (Didier, Didier *et al.* 1991). Depuis une cinquantaine de cas ont été rapportés chez les sujets infectés par le VIH. Ce parasite a pour cible l'épithélium superficiel de la cornée et la conjonctive, où sa multiplication est la cause de microsporidioses oculaires. Il peut également être à l'origine de pathologies respiratoires ou urinaires, voire d'infections disséminées lorsque l'immunodéficience est sévère (Kotler and Orenstein 1998).

Récemment, *E. hellem* a été identifiée chez des oiseaux de volière tels que les perroquets et les perruches (Black, Steinohrt *et al.* 1997; Pulparampil, Graham *et al.* 1998). Cette observation suggère l'existence d'un réservoir aviaire pour cette microsporidie. Cette hypothèse est renforcée par le fait que certains patients atteints de kératoconjonctivites dues à *E. hellem* ont fréquemment été exposés à des oiseaux domestiques.

*E. cuniculi* constitue l'espèce microsporidienne la plus répandue chez les mammifères (Canning and Hollister 1987; Snowden, Logan *et al.* 1999). Décrite dès 1922 chez le lapin, ce parasite a, par la suite, été détecté notamment chez les rongeurs (rat et souris), les animaux carnivores (chien, chat et renard) et les primates non humains (singes). Des analyses moléculaires ont permis d'identifier trois souches d'*E. cuniculi* parmi les nombreux isolats d'origine animale : la souche I (souche "lapin"), la souche II (souche "souris") et la souche III (souche "chien") (Didier, Vossbrinck *et al.* 1995). Chacune de ces souches semble avoir une spécificité d'hôte et des caractéristiques épidémiologiques différentes. Chez l'homme, *E. cuniculi* est associée à des encéphalites, des hépatites et très souvent à des infections disséminées (Franzen and Muller 2001). *E. cuniculi* a ainsi été observée dans plusieurs cas sévères de microsporidioses disséminées, chez des patients infectés par le VIH présentant ou non un statut de SIDA déclaré (Franzen, Schwartz *et al.* 1995; Weber, Deplazes *et al.* 1997).

*E. intestinalis* fut observée pour la première fois en 1992 dans les entérocytes et la *lamina propria*, au niveau de l'intestin grêle d'un patient au stade SIDA présentant des diarrhées chroniques (Orenstein, Tenner *et al.* 1992). D'abord décrite sous le nom

de *Septata intestinalis*, ce parasite fut ensuite reclassé en tant qu'*E. intestinalis*, sur la base des données issues de l'analyse phylogénétique des séquences codant pour l'ARNr 16S (Cali, Kotler *et al.* 1993; Hartskeerl, Van Gool *et al.* 1995). Cette microsporidie se singularise des autres espèces du même genre, par l'aspect cloisonné de sa vacuole parasitophore ; celui-ci est dû à la sécrétion par les mérontes, lors de leur différenciation en sporontes, d'un matériel fibrillaire qui entoure les stades parasitaires.

#### III.1.6. Genre *Enterocytozoon*

*Enterocytozoon bienewisi*, espèce la plus fréquente chez l'homme, est la seule représentante du genre. Son existence est révélée par l'étude de biopsies obtenues à partir de l'intestin grêle d'un patient haïtien de 29 ans atteint de SIDA et souffrant d'entérite grave (Modigliani, Borjes *et al.* 1985). *E. bienewisi* constitue aujourd'hui l'espèce la plus souvent rencontrée chez l'homme (Bryan and Schwartz 1999). Elle infecte préférentiellement les entérocytes de l'épithélium de l'intestin grêle, à l'intérieur desquels tous les stades de développement sont localisés au pôle apical de la cellule (entre le noyau et les microvillosités). L'infection reste le plus souvent localisée au niveau de l'intestin grêle. Cependant, *E. bienewisi* a également été observée, dans certains cas, au niveau des cellules non parenchymateuses du foie, des cellules épithéliales du tractus biliaire et de la vésicule biliaire, et des cellules de l'épithélium de la trachée ainsi que des épithéliums bronchique et nasal.

Tableau III. Espèces de Microsporidies Infectant l'Homme. (Mathis, Weber *et al.* 2005)

Espèces	Découverte			Nombre de patients		Sites de l'infection	Hôte(s) animal
	Hôtes	Année	Références	ID <sup>(1)</sup>	IC <sup>(2)</sup>		
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Humain	1985	(Desportes 1985)	>1000	<20	Intestin, tractus biliaire et respiratoire	Vertébrés
<i>Encephalitozoon hellem</i>	Humain	1991	(Didier, Didier <i>et al.</i> 1991)	<50	3	Yeux, tractus urinaire, respiratoire, infection systémique	Oiseaux
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Humain	1993	(Hartskeerl, Van Gool <i>et al.</i> 1995)	<200	2	Intestin, tractus biliaire, respiratoire, peau, infection systémique	Mammifères
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Lapin	1923	(Levaditi, Nicolau <i>et al.</i> 1923)	<20	(3)	Infection systémique, yeux, foie, péritoine, cerveau, tractus urinaire	Mammifères
<i>Vittaforma corneae</i>	Humain	1990	(Silveira and Canning 1995)	1	3	Yeux, tractus urinaire	?
<i>Vittaforma-like<sup>(4)</sup></i>	Humain	2003	(Sulaiman, Matos <i>et al.</i> 2003)	22	3	Intestin	?
<i>Pleistophora ronniae</i>	Humain	1985	(Cali and Takvorian 2003)	1 <sup>(5)</sup>		Muscle	?
<i>Trachipleistophora hominis</i>	Humain	1996	(Hollister, Canning <i>et al.</i> 1996)	1	1	Muscle, yeux	?
<i>Tachipleistophora anthropoptera</i>	Humain	1998	(Vavra, Yachnis <i>et al.</i> 1998)	3		Infection systémique, yeux	?
<i>Brachiola algerae</i>	Moustique	1970	(Vavra and Undeen 1970)	1 <sup>(6)</sup>	1	Yeux, muscle	Moustiques
<i>Brachiola connori</i>	Humain	1974	(Sprague 1974)	1 <sup>(7)</sup>		Infection systémique	?
<i>Brachiola vesicularum</i>	Humain	1998	(Cali, Meisler <i>et al.</i> 1991; Cali, Takvorian <i>et al.</i> 1998)	1		Muscle	?
<i>Nosema ocularum</i>	Humain	1991	(Cali, Meisler <i>et al.</i> 1991)	1	1	Yeux	?
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	Humain	1973	(Canning, Curry <i>et al.</i> 1998)	1		Yeux	?
<i>Microsporidium africanum</i>	Humain	1981	(Pinnolis, Egbert <i>et al.</i> 1981)	1		Yeux	?

(1) Immunodéprimés : Patients séropositifs pour le VIH, patients sidéens, et patients transplantés

(2) Immunocompétents, en bonne santé

- (3) Deux patients de status inconnus, probablement immunodéprimés
- (4) Résultats obtenus par PCR et séquençage, nécessite une confirmation
- (5) Immunité cellulaire déficiente, non HIV
- (6) Immunodéprimé par agents immunosuppresseur (Polyarthrite Rhumatoïde)
- (7) Aplasie thymique

### III.2. Immunité anti-microsporidienne

Le système immunitaire joue un rôle crucial dans le contrôle des infections microsporidiennes. Les sujets immunodéprimés sont donc principalement touchés (patients greffés sous traitement immunosuppresseur ou patients séropositifs pour le VIH) (Weber, Bryan *et al.* 1994; Kotler and Orenstein 1998). Les formes les plus sévères affectent les individus au stade SIDA, en particulier lorsque le taux de CD4 est inférieur à 100/mm<sup>3</sup>. A l'inverse, les microsporidioses sont a priori spontanément résolutive chez le sujet immunocompétent.

L'intérêt pour l'immunologie des microsporidies s'est accru ces dernières années suite à l'émergence du SIDA. Cependant, les études concernant ce domaine sont peu nombreuses et l'immunité anti-microsporidienne reste encore peu étudiée. Chez l'homme, elle induit à la fois le développement d'une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire (Didier 2000; Didier, Didier *et al.* 2000)

#### III.2.1. Immunité humorale

Chez les animaux immunocompétents, l'infection expérimentale avec *E. cuniculi* induit la production d'anticorps sériques spécifiques, appartenant aux trois principales classes d'immunoglobulines, IgM, IgG et IgA (Didier, Didier *et al.* 2000). Les anticorps de type IgM sont les premiers à apparaître dans le sérum et disparaissent dans les premiers mois suivant l'infection. A l'inverse, les anticorps de type IgG apparaissent plus tardivement et persistent à des taux relativement élevés en général tout au long de la vie de l'hôte. La détection simultanée d'IgM et d'IgG signale donc le caractère récent de la microsporidiose, tandis que la détection permanente d'IgG montre la persistance d'une infection chronique. Plusieurs études ont montré que la voie d'inoculation des spores influence la cinétique de développement de la réponse humorale.

Chez l'homme, la cinétique de production des anticorps au cours des microsporidioses n'est pas connue. Néanmoins, les singes macaques rhésus infectés par voie intraveineuse avec *E. cuniculi*, *E. hellem* ou *E. intestinalis* présentent une réponse anticorps semblable à celle observée chez les lapins et les souris inoculés par la voie parentérale avec *E. cuniculi* (Didier and Shaddock 1994). Chez les animaux

immunodéprimés, le développement de la réponse humorale antimicrosporidienne dépend du statut immunitaire de l'hôte. De façon similaire, les patients infectés par le VIH et atteints de microsporidiose présentent une réponse humorale antimicrosporidienne variable, selon leur statut immunologique au moment de leur contamination par les microsporidies.

Des résultats démontrent que les anticorps ne sont pas suffisants pour permettre le contrôle et l'éradication des infections microsporidiennes. De plus, plusieurs études *in vitro* suggèrent un rôle des anticorps dans la limitation de la dissémination de l'infection. Les anticorps peuvent en effet induire la destruction des microsporidies en favorisant la phagocytose des spores par les macrophages ou bien en induisant l'activation du complément susceptible d'entraîner la lyse des stades parasites. Par ailleurs, des anticorps monoclonaux dirigés contre l'exospore ou le filament polaire sont capables d'inhiber l'infection de cellules non phagocytaires par les microsporidies du genre *Encephalitozoon* (Enriquez, Wagner *et al.* 1998).

En résumé, il semble donc que les anticorps contribuent à la protection naturelle vis-à-vis des infections microsporidiennes, même si leur rôle est probablement mineur.

### III.2.2. Immunité cellulaire

La majorité des études ont montré que les microsporidies sont largement associées à une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Schmidt and Shadduck 1984; Khan, Schwartzman *et al.* 1999) avec une production de cytokines de type Th1, en particulier interféron gamma et IL-12 (Khan, Moretto *et al.* 2001)

Le caractère opportuniste des microsporidies intestinales a été l'un des premiers indices suggérant l'importance de la réponse immune à médiation cellulaire dans le contrôle des infections microsporidiennes. Plusieurs études ont montré une certaine corrélation entre la diminution du taux de lymphocytes T CD4+ dans le sang des patients infectés par le VIH, et l'augmentation de l'intensité des signes cliniques associés à la microsporidiose intestinale (Asmuth, DeGirolami *et al.* 1994; Hutin, Sombardier *et al.* 1998; Kotler and Orenstein 1998). A l'inverse, la restauration plus ou moins complète de l'immunité cellulaire (augmentation du taux de T CD4+) observée chez les patients atteints de SIDA traités avec les multi-thérapies anti-rétrovirales, s'accompagne d'une amélioration voire même d'une rémission de la pathologie intestinale associée aux microsporidies (Goguel, Katlama *et al.* 1997; Conteas, Berlin

*et al.* 1998). La réponse immunitaire à médiation cellulaire apparaît être la plus importante pour la prévention.

### III.2.3. Immunité muqueuse

La muqueuse intestinale, première ligne de défense de l'hôte contre le parasite suite à l'ingestion des spores, est constituée d'un épithélium soutenu par un tissu conjonctif appelé *lamina propria*. Elle forme non seulement une importante surface d'échange avec le milieu extérieur et une barrière physiologique et immunologique contre un grand nombre de substances étrangères et de micro-organismes.

Plusieurs facteurs non immunologiques assurent la défense de la muqueuse intestinale vis-à-vis des pathogènes. Le péristaltisme intestinal associé au mucus et au glycocalyx permet de réduire les interactions éventuelles entre les pathogènes et les cellules épithéliales. Enfin, le caractère cohésif de l'épithélium dû aux jonctions étroites entre les cellules épithéliales empêche le passage intercellulaire des agents pathogènes. La protection de la muqueuse intestinale est également assurée par le tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal ou GALT, en particulier lorsque les mécanismes de défense non spécifiques ont échoué. Le GALT ("*gut-associated lymphoid tissue*") contient à lui seul plus de cellules immunitaires que le reste de l'organisme et peut être morphologiquement et fonctionnellement divisé en deux parties : d'une part les plaques de Peyer, sites inducteurs de la réponse immunitaire intestinale, et d'autre part les lymphocytes répartis au sein de l'épithélium intestinal (lymphocytes intraépithéliaux ou LIEs) et de la *lamina propria*, sites effecteurs de la réponse immune. La voie orale constitue la voie naturelle d'entrée des microsporidies humaines *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* dans l'organisme. Les entérocytes de l'épithélium intestinal sont ainsi le premier et principal site de multiplication de ces parasites (Kotler and Orenstein 1998; Franzen and Muller 1999).

## IV. Microsporidioses intestinales humaines

L'infection microsporidienne la plus fréquente en pathologie humaine est la microsporidiose intestinale. Deux espèces sont impliquées de façon prévalente dans cette pathologie : *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* (Coyle, Wittner *et al.* 1996).

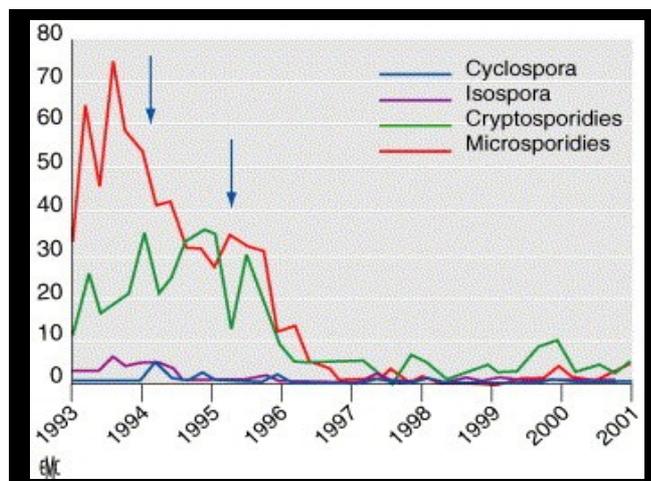
### IV.1.Épidémiologie

L'épidémiologie des microsporidies est encore mal connue, cependant, les outils et méthodes diagnostiques commencent à apporter des informations extrêmement intéressantes sur l'origine de ces infections, leur transmission et la prévalence réelle des parasites.

#### IV.1.1.Répartition et prévalence

La microsporidiose humaine est présente à travers le monde, sur tous les continents excepté l'Antarctique (Bryan and Schwartz 1999), mais la prévalence varie largement en fonction des méthodes diagnostiques utilisées. Avant « la pandémie de SIDA », les microsporidies n'étaient que très rarement retrouvées chez l'homme (Kotler and Orenstein 1998). Depuis le premier cas retrouvé en France en 1985, l'infection humaine à *E. bieneusi* est bien documentée aux Etats-Unis, dans divers pays d'Europe de l'Ouest, en Australie, quelques études en Afrique. Quelques données sont disponibles concernant l'Amérique du Sud et l'Asie. *Enterocytozoon bieneusi* est donc un parasite cosmopolite. L'ensemble des études de prévalence de la littérature est regroupé en Annexe 1.

La microsporidiose était une infection prévalente des patients infectés par le VIH dans les années 1990, retrouvée en Amérique du Nord, Europe de l'Ouest, Australie, elle atteignait 40% aux Etats-Unis (Kotler and Orenstein 1994). Le nombre de cas a chuté depuis que des traitements restaurent l'immunité des patients infectés par le VIH, de même pour les autres infections opportunistes (*Cyclospora*, *Isospora*, *Cryptosporidium*). (Figure 10)



**Figure 10. Parasites opportunistes intestinaux détectés chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine de 1993 à 2001 à la Pitié Salpêtrière. La chute du nombre de cas en 1994 et en 1996 est l'effet des traitements par la bithérapie, puis par la trithérapie antirétrovirale hautement active. (Desportes-Livage and Datry 2005)**

Actuellement, les microsporidies sont surtout détectées dans la population infectée par le VIH en Asie du Sud-est (Inde, Thaïlande), au Proche-Orient (Turquie), en Afrique (Tunisie, Mali, Ouganda, Sénégal, Zimbabwe), en Amérique Latine (Brésil, Pérou). Selon les études, la microsporidiose affecte de 2 à 50% des patients. Ces différences tiennent probablement au mode de recrutement des patients (âge, sexe, degré d'immunodépression, symptômes cliniques...), à l'origine des prélèvements examinés, à l'absence de standardisation des techniques de diagnostic utilisées et de consensus sur l'association ou pas de deux techniques différentes, avant d'envisager une répartition géographique différente ou l'exposition à d'éventuels facteurs de risque.

Par ailleurs, l'amélioration, ces dix dernières années, du diagnostic et notamment l'apport de la biologie moléculaire doit être pris en considération.

D'autres causes d'immunodéficience constituent des facteurs de risque : la microsporidiose intestinale affecte aussi les patients ayant subi une transplantation

d'organe (foie, cœur, poumon) (Gumbo, Hobbs *et al.* 1999) et traités par les immunosuppresseurs. Dans la seule ville de Lyon, 23 cas ont été colligés entre 1993 et 2001 (Rabodonirina, Cotte *et al.* 2003).

La malnutrition et le vieillissement seraient à l'origine de cas rapportés chez des sujets non infectés par le VIH selon des enquêtes réalisées dans des orphelinats et une maison de retraite en Espagne (Valperga, de Jogna Prat *et al.* 1999; Lores, Lopez-Miragaya *et al.* 2002; Mungthin, Subrungruang *et al.* 2005).

De plus, les espèces *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* sont la cause de diarrhées spontanément résolutive chez les voyageurs immunocompétents ayant séjourné en zone tropicale (van Gool, Vetter *et al.* 1997; Raynaud, Delbac *et al.* 1998; Lopez-Velez, Turrientes *et al.* 1999; Goodgame 2003; Wichro, Hoelzl *et al.* 2005). La détection de spores dans les selles de sujets ne présentant aucune pathologie indique l'existence d'un portage asymptomatique de ces parasites, confirmé par des analyses sérologiques (van Gool, Vetter *et al.* 1997).

Dans une étude réalisée au Mexique, des spores d'*E. intestinalis* ont été observées dans presque 8% des échantillons de selles prélevés chez les habitants de deux communes rurales agricoles des environs de Mexico (Enriquez, Taren *et al.* 1998). L'existence d'infections dues à *E. intestinalis* chez les personnes immunocompétentes a été confirmée par des études sérologiques réalisées chez des donneurs de sang néerlandais et chez des femmes enceintes françaises. Les résultats obtenus indiquent des taux de prévalence relativement importants (respectivement 8 et 5%) au sein de ces deux populations pour les anticorps anti-*E. intestinalis* (van Gool, Vetter *et al.* 1997). L'ensemble de ces observations suggère que les microsporidioses intestinales seraient des infections asymptomatiques assez fréquentes parmi les personnes immunocompétentes, sporadiques, transitoires voire même peut-être latentes.

**Les microsporidies sont des parasites ubiquitaires et retrouvés dans tous les pays où ils ont fait l'objet de recherche. Différentes données indiquent que les microsporidioses intestinales à *E. bienewisi* et *E. intestinalis* sont surtout des infections opportunistes, endémiques chez les patients infectés par le VIH, sporadiques, transitoires et asymptomatiques chez les sujets immunocompétents.**

#### IV.1.2. Influence saisonnière

Les études effectuées au Brésil et dans la Sud de la Californie n'ont rapporté aucune influence de la saison (sèche ou humide) sur le nombre de cas de microsporidioses intestinales chez les sujets séropositifs pour le VIH (Wuhib, Silva *et al.* 1994; Conteas, Berlin *et al.* 1998). De même, une étude effectuée en région nantaise a montré qu'il n'y avait aucun déséquilibre dû au facteur saisonnier dans la survenue des microsporidioses intestinales (Sparfel, Auget *et al.* 1998). Cependant, la saison des pluies a récemment été associée à une recrudescence des cas de microsporidioses intestinales lors d'une enquête épidémiologique réalisée en Afrique sur une cohorte d'enfants atteints de diarrhées (Tumwine, Kekitiinwa *et al.* 2002).

#### IV.1.3. Mode de transmission

Les microsporidies sont des émergents, par la découverte de nouvelles espèces, reconnues depuis peu comme pathogènes pour l'homme. Seulement quelques études ont été menées pour déterminer la source et le mode de transmission.

L'origine et le mode de transmission des microsporidioses intestinales chez l'homme restent mal connus. Pour Didier (2000), les microsporidioses chez les mammifères surviennent très certainement après ingestion ou inhalation de spores. Chez l'homme, la transmission semble aussi probable à la suite d'un contact direct ou d'un traumatisme.

La présence du parasite au niveau du tractus intestinal, site privilégié de l'infection, et l'atteinte des épithéliums bronchique et nasal dans le cas des microsporidioses disséminées, suggèrent plusieurs modes de contaminations possibles : oro-fécal par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés (Sparfel, Sarfati *et al.* 1997; Dowd, Gerba *et al.* 1998), par inhalation des spores ou par aérosol. Dans deux études ont montré une contamination par l'eau de boisson, mais elle n'était pas une source majeure de contamination (Wuhib, Silva *et al.* 1994; Conteas, Berlin *et al.* 1998). Une autre étude a mis en évidence dans une cohorte urbaine de patients HIV positifs, le rôle du contact

professionnel avec l'eau de station thermale, comme facteurs de risque de microsporidiose intestinale (Dascomb, Frazer *et al.* 2000)

D'autres facteurs de risque comme la consommation de différentes sortes de boissons, de nourritures pas assez cuites, l'exposition aux animaux (chats, chiens, oiseaux, poissons ou abeilles), ou activités récréatives (nager en eaux douces, dans la mer, voyages à l'étranger) se sont avérés ne pas être liés au risque d'infection. Cependant l'étude des différents génotypes de *E. bienewsi*, retrouvé à la fois chez des hommes comme chez certains animaux (Tableau XXV) suggère une transmission zoonotique (Mathis, Weber *et al.* 2005) ou bien une adaptation du parasite à l'homme.

De plus, la transmission inter-humaine a été évoquée dans plusieurs études (Mungthin, Suwannasaeng *et al.* 2001; Leelayoova, Subrungruang *et al.* 2005), certaines impliquaient l'homosexualité masculine et la cohabitation avec un sujet HIV positif infecté en tant que facteurs de risque d'acquérir une microsporidiose intestinale (Watson, Asmuth *et al.* 1996; Hutin, Sombardier *et al.* 1998).

Par ailleurs, les infections asymptomatiques chez les patients infectés par le VIH et les immunocompétents suggèrent l'existence de porteurs sains. Chez des individus immunocompétents, une étude a fait mention de la présence d'anticorps anti-microsporidies dans 8% de la population (van Gool, Vetter *et al.* 1997)

Les infections chez des patients transplantés aussi bien que chez les patients immunocompétents sont probablement dues à un contact direct avec une personne infectée par le SIDA (Mathis, Weber *et al.* 2005).

Une étude a fait mention du risque d'infection lié aux voyages (Cornet, Romand *et al.* 1996) mais non démontré dans une autre étude (Dascomb, Frazer *et al.* 2000)

La transmission placentaire a été observée chez les primates se manifestant par des infections néonatales (Canning 1993)

**L'eau, les aliments souillés et les animaux pourraient être des sources de contamination pour l'homme, notamment en raison de la viabilité des spores dans le milieu extérieur. La contamination interhumaine a été montrée. Le potentiel zoonotique de la transmission ne peut être exclu.**

#### IV.1.4.Réservoirs

Les microsporidies ne sont pas des parasites spécifiques de l'homme. Les espèces retrouvées le plus fréquemment retrouvées chez l'homme, ont été identifiées chez diverses hôtes mammifères.

Des spores de *E. intestinalis* et *E. bienewsi* ont été identifiées chez des animaux de compagnie et d'élevage (chien, chat, porc, chèvre, âne, bovins, lapins) (Deplazes, Mathis *et al.* 2000). *E. bienewsi* est trouvé chez des mammifères sauvages (renards, loutres, ragondins, raton laveurs) (Sulaiman, Fayer *et al.* 2003) et chez des oiseaux : poulets d'élevage industriel (Reetz, Rinder *et al.* 2002), pigeons vivant en zone urbaine (Haro, Izquierdo *et al.* 2005). L'analyse des séquences génomiques témoigne de l'existence de plusieurs souches de *E. bienewsi* chez l'homme et chez l'animal. La présence de souches identiques chez les patients et certaines espèces animales atteste de la transmission interspécifique du parasite (Sulaiman, Fayer *et al.* 2003). Une seule souche de *E. intestinalis* est identifiée chez l'homme comme chez les différents mammifères infectés par cette espèce. Le portage asymptomatique par l'homme et les animaux immunocompétents est une source potentielle de contamination pour les sujets fragilisés et immunodéprimés.

#### IV.2.Physiopathologie

Les mécanismes induisant la diarrhée au cours de la microsporidiose intestinale sont encore mal connus. Les espèces *E.bienewsi* et *E.intestinalis* colonisent l'épithélium de l'intestin grêle. L'altération de la muqueuse intestinale se manifeste par l'aplatissement de l'assise épithéliale, l'accumulation de graisses et une desquamation importante, qui a pour conséquence une atrophie villositaire compensée par l'hyperplasie des cryptes, et la réduction de la surface d'absorption (jusqu'à 40%). Le « turn-over » des entérocytes est accéléré, les entérocytes sont immatures et présentent un déficit fonctionnel. L'atteinte fonctionnelle résulte de la chute des activités enzymatiques, de la

malabsorption des graisses, des déficits en potassium, magnésium, vitamine B12 (Asmuth, DeGirolami *et al.* 1994), et de la chute du bicarbonate sérique.

La dissémination d'*E. intestinalis* induit des réactions inflammatoires dans les organes infectés.

### IV.3. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques des microsporidioses chez l'homme dépendent en fait du site de l'infection. Les localisations anatomiques des microsporidioses apparaissent très variées : tractus gastro-intestinal, oculaire, cérébral, pulmonaire.

#### IV.3.1. Manifestations intestinales

Le symptôme principal est la diarrhée chronique avec selles aqueuses, non sanglantes, à raison de 3 à 10 par jours. Elle est associée à des nausées, des douleurs abdominales, une perte de poids progressive, avec malabsorption des graisses, du D-Xylose et de la Vitamine B12. Les diarrhées qui apparaissent progressivement, semblent être aggravées par l'ingestion d'aliments et tendent à être plus fréquentes le matin. Bien que l'appétit soit normal, voire même augmenté, les patients limitent leur alimentation par crainte d'exacerber leurs symptômes. Dans les formes les plus graves, une déshydratation entraîne une cachexie. La symptomatologie chez l'immunocompétent se limite le plus souvent à une diarrhée spontanément résolutive. Enfin, des cas asymptomatiques sont suggérés par la présence de spores dans des selles d'enfants non diarrhéiques (Valperga, de Jogna Prat *et al.* 1999). Les manifestations les plus sévères sont consécutives à l'extension de l'infection en l'absence du contrôle normalement exercé par l'immunité cellulaire.

Il n'existe aucune corrélation entre la quantité de spores excrétées dans les selles et la sévérité du syndrome diarrhéique (Clarridge, Karkhanis *et al.* 1996; Goodgame, Stager *et al.* 1999). *Enterocytozoon bienewisi* ne met jamais en jeu le pronostic vital du patient, bien que la cachexie consécutive aux diarrhées chroniques et l'importante perte de poids soient des cofacteurs du décès de nombreux patients (Molina, Sarfati *et al.* 1993). L'association microsporidies intestinales et autres enteropathogènes est relativement fréquentes et retrouvée chez un tiers des patients environ.

Cependant les effets pathologiques exercés par *E. bienewisi* sont encore mal définis. Dans une étude concernant 106 patients, aucune différence significative, n'a été retrouvée quant à la présence d'*E. bienewisi* dans les selles chez les diarrhéiques et non diarrhéiques (Rabeneck, Gyorkey *et al.* 1993). Cette publication est la première à suggérer le portage asymptomatique et relativise la pathogénicité des microsporidies intestinales. Inversement, les autres études ont mis en évidence chez les patients infectés par le VIH la corrélation entre la diarrhée, la présence de microsporidies et la chute du taux de CD4 (Eeftinck Schattenkerk, van Gool *et al.* 1991; Orenstein 1991; Bernard, Carles *et al.* 1995; Coyle, Wittner *et al.* 1996; Navin, Weber *et al.* 1999). En outre les microsporidies sont les seuls agents identifiés chez les patients présentant des altérations histopathologiques et des anomalies fonctionnelles comme la malabsorption.

*Encephalitozoon intestinalis* a pour première cible l'intestin grêle, le colon et le tractus biliaire, responsable de la même symptomatologie digestive que *E. bienewisi*. Les infections intestinales non traitées peuvent conduire à des perforations et des péritonites. Le parasite se développe dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les macrophages du chorion qui disséminent dans l'organisme.

La dissémination de *E. intestinalis* induit des réactions inflammatoires dans les organes infectés (Desportes-Livage 2003)

Des cas de coinfection par les deux espèces de microsporidies intestinales sont rapportés (Blanshard, Hollister *et al.* 1992; van Gool, Canning *et al.* 1994; Franzen, Muller *et al.* 1996).

Les infections à *E. bienewisi* sont diagnostiquées de plus en plus fréquemment chez les patients présentant d'autres formes d'immunosuppression, essentiellement les transplantés d'organes solides. La présence de la microsporidie doit être considérée lors de la survenue d'une diarrhée chronique inexplicée et d'une perte de poids, notamment après le renforcement du traitement immunosuppresseur pour éviter un rejet (Gumbo, Hobbs *et al.* 1999; Metge, Van Nhieu *et al.* 2000).

Chez l'immunocompétent, la symptomatologie digestive est plus atypique. Les patients diarrhéiques ou non se plaignent souvent de météorisme intestinal.

#### IV.3.2. Manifestations extra intestinales

- Cholangites

*E. bienewisi* et *E. intestinalis* peuvent entraîner des cholangites associées au syndrome diarrhéique. La cholangite se révèle en général par des douleurs abdominales prédominantes à l'hypochondre droit associées à une cholestase biologique non ictérique. Les spores peuvent se retrouver de façon disséminées dans les biopsies duodénales, hépatiques, au niveau de la bile, du cholédoque, de la vésicule biliaire (Beaugerie, Teilhac *et al.* 1992; Pol, Romana *et al.* 1993; Sheikh, Prindiville *et al.* 2000)

- Infections oculaires

A côté des infections gastro-intestinales, les manifestations oculaires sont courantes chez les hommes. Chez les patients HIV, les kératoconjunctivites sont dues à *Encephalitozoon spp.*

- Sinusites

Les sinusites sont des manifestations communes des microsporidioses humaines.

*E. intestinalis* a causé des sinusites chez des patients SIDA.

Moins fréquemment, *E. bienewisi* a été isolé de biopsies de patients HIV. (Franzen, Muller *et al.* 1996; Kotler and Orenstein 1998)

- Infections pulmonaires

Les localisations extra intestinales des microsporidioses sont rares et parmi celles-ci, il existe des localisations du tractus respiratoire le plus souvent dues à *Encephalocytozoon sp.* Actuellement quelques cas de localisations pulmonaires à *Enterocytozoon bienewisi* ont été décrits dans la littérature. L'atteinte pulmonaire pourrait être acquise par différents mécanismes : inhalation, régurgitation, contamination oro-fécale directe ou par dissémination hématogène à partir du tube digestif. (Botterel, Minozzi *et al.* 2002)

- Infections du tractus urinaire

Les infections du tractus urinaire sont fréquemment rencontrées chez les patients VIH avec une dissémination de l'infection à *Encephalitozoon*. La présentation clinique peut se présenter sous différentes formes : microhématurie, cystite, dysurie, atteinte rénale. (Boldorini, Monga *et al.* 1998)

- Rares manifestations : méningite, urétrite, abcès prostatique, infections systémiques (Rabaud, Georges *et al.* 1999), microsporidioses cutanées.

***E. bienewsi* et *E. intestinalis* sont responsables d'entérites avec diarrhées chroniques, profuses avec de perte de poids et de malabsorption, sans glaire, ni sang, ni fièvre, L'espèce *Encephalitozoon* peut disséminer dans l'organisme.  
Les localisations extra-digestives existent mais elles restent rares.**

#### IV.4.Diagnostic

Le diagnostic des microsporidioses intestinales repose sur la mise en évidence et l'identification de l'espèce du parasite dans les différents prélèvements : tissus, biopsies et/ou substances biologiques (urines, selles, lavages broncho-alvéolaires, liquides d'aspiration duodénales, prélèvements oculaires (Franzen and Muller 2001; Garcia 2002).

Le diagnostic de ces parasites est rendu difficile par a localisation intracellulaire des stades de développement, la taille très réduite (1 à 5 µm) des spores émises dans les selles. Alors que les premiers diagnostics reposaient sur l'analyse histologique et ultrastructurale de biopsies de l'intestin grêle, l'effort intense déployé ces dix dernières années par de nombreuses équipes a permis la mise au point de techniques de diagnostic plus simples et plus performantes. A l'heure actuelle, si la microscopie électronique à transmission reste la technique de référence, la mise en évidence des microsporidies en microscopie optique dans les différents prélèvements est désormais possible. D'autres voies ont été explorées, nous retiendrons les techniques immunologiques ainsi que les techniques de biologie moléculaire qui permettent un diagnostic de certitude assez rapidement. De plus, la distinction entre les différentes espèces est importante (*E. intestinalis* est capable, à la différence de *E.bienewsi*, de disséminer et de toucher d'autres organes que le tractus digestif). Dans les biopsies de tissus, tous les stades de développement sont en général visibles, tandis que seules les spores sont observables dans les échantillons de selles ou autres liquides biologiques. En pratique, la recherche de spores dans les selles constitue l'approche diagnostique préférentielle du fait de son caractère non invasif. (Tableau 4)

##### IV.4.1.Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (MET) a été la première technique utilisée pour diagnostiquer les microsporidioses humaines, en raison de la taille réduite des spores. La détection des microsporidies est basée sur l'examen cytologique et histologique des prélèvements et permet de visualiser les caractéristiques ultrastructurales des microsporidies. Cette technique permet également de déterminer le genre et l'espèce de la microsporidie incriminée, grâce à l'observation des caractères morphologiques de la spore et des différents stades de développement.

La microscopie électronique n'est pas adaptée au diagnostic de routine en laboratoire, elle nécessite un temps non négligeable ainsi qu'un opérateur entraîné. Elle reste néanmoins le « Gold Standard », pour la confirmation et l'identification d'espèces dans les laboratoires n'utilisant pas la biologie moléculaire. (Figure 11)

#### IV.4.2. Microscopie optique

Depuis quelques années, de nouvelles méthodes de coloration ont été décrites. La microscopie optique contribue au diagnostic de l'infection à microsporidie, mais son espèce reste incertaine.

Les spores de microsporidies peuvent être recherchées dans de nombreux prélèvements (urine, aspiration duodénale, prélèvements respiratoires, LCR...) (Garcia 2002).

##### IV.4.2.1. Examens histopathologiques

L'examen histologique des biopsies duodénales et iléales permet le diagnostic de microsporidioses intestinales. Les spores sont généralement retrouvées dans l'intestin grêle à l'extrémité des entérocytes. Les biopsies peuvent être obtenues sous fibroscopie, coloscopie et endoscopie digestive. *E. bienewisi* ne se retrouve ni au niveau de l'œsophage et de l'estomac, ni au niveau du colon et du rectum, alors que *E. intestinalis* peut infecter le rectum, les voies urinaires et les reins.

Les microsporidies ne sont pas facilement identifiables avec les colorations classiques telles que la coloration au Gram ou à l'hématoxyline éosine (Orenstein, Dieterich *et al.* 1993). Les colorations par le Giemsa, le bleu de toluidine, le Gram modifié, ou le trichrome semblent plus performantes. Les techniques de fluorescence directe, testées plus récemment et qui sont basées sur le marquage par un fluorochrome sont sensibles, rapides et faciles à réaliser tant sur les appositions que sur les coupes de tissus inclus en paraffine.

#### IV.4.2.2.Examens parasitologiques directs

##### ❖ Examens des selles

###### ○ Colorations au Giemsa et au Gram

La technique de Giemsa est la première utilisée, le cytoplasme des spores apparaît coloré en bleu-gris, et parfois on peut voir le noyau violet caractéristique. Ces colorations sont difficiles à lire. Elles ne permettent pas une différenciation suffisante entre les microsporidies et les autres éléments de même taille présents dans les échantillons, comme les bactéries par exemple.

###### ○ Coloration au trichrome

La technique dite trichrome de Weber est actuellement l'une des plus employées (Weber, Bryan *et al.* 1992). Cette technique résulte d'une modification de la méthode classique de Wheatley avec utilisation d'une concentration 10 fois plus importante de chromotrope 2R. Cette modification est à l'origine d'une meilleure détection des spores qui apparaissent en rose-rouge vif avec une vacuole transparente et un point rouge vif situé à l'extrémité opposée de la vacuole le tout sur un fond vert (Franzen and Muller 1999). La technique de Weber apparaît comme étant la meilleure et donnant les résultats les plus fiables (référence ??). Cependant, la réalisation de la coloration reste délicate et relativement longue. La lecture est longue, difficile surtout si les spores sont rares dans l'échantillon et nécessite de l'expérience. (Figure 12)

###### ○ Agents chimioluminescents

Les agents chimioluminescents utilisés pour le diagnostic des microsporidies sont l'Uvitex 2B, le Calcofluor White 2MR et le Fungifluor. Ces molécules, dérivées du stilbène, se fixent sélectivement sur la chitine présente dans la paroi des spores microsporidiennes et lui donne un aspect bleu brillant. Cette méthode, spectaculaire lorsqu'elle est appliquée à des échantillons de spores isolées, s'avère moins spécifique avec les frottis obtenus à partir des selles susceptibles de contenir d'autres éléments riches en chitine. En effet, les éléments fongiques apparaissent bleu-fluorescents. Si la taille permet d'écarter les levures, les spores de champignons filamenteux restent difficiles à identifier. Des débris d'origine végétale peuvent également être fluorescent.

Van Gool, évaluant sa technique sur trois groupes de patients diarrhéiques infectés par le VIH, retrouve une sensibilité et une spécificité de 100% pour cette méthode ! (van Gool, Canning *et al.* 1994). (Figure 13)

#### ❖ Autres liquides biologiques

Les spores de microsporidies peuvent aussi être détectées dans les liquides d'aspiration duodénale, la bile, les urines, les lavages broncho-alvéolaires, et les ponctions sinusales. Pour l'examen cytologique de ces prélèvements, qui contiennent pas ou peu de bactéries, d'éléments fongiques ou d'autres débris, les colorations de Gram, Giemsa ou à l'Uvitex 2B peuvent être pratiquées (van Gool, Snijders *et al.* 1993; Weber, Bryan *et al.* 1994; Didier, Orenstein *et al.* 1995; Contreas, Sowerby *et al.* 1996). Un diagnostic de certitude est alors obtenu en utilisant la coloration de Weber modifiée.

#### IV.4.3. Immunodiagnostic

En 1980, les premières techniques d'IFI faisant appel à des anticorps polyclonaux ont montré l'existence d'une communauté antigénique entre différentes espèces de microsporidies. Plusieurs anticorps mono- ou polyclonaux ont été produits contre les différentes espèces du genre *Encephalitozoon* (Aldras, Orenstein *et al.* 1994; Enriquez, Ditrich *et al.* 1997). A l'heure actuelle, seuls des anticorps monoclonaux anti-*E. hellem* (Croppo, Visvesvara *et al.* 1998) et anti-*E. intestinalis* (Beckers, Derks *et al.* 1996; Enriquez, Wagner *et al.* 1998; Bouladoux, Biligui *et al.* 2003) se sont montrés spécifiques d'espèces en IFI et seuls de tels anticorps peuvent permettre la détection et l'identification de l'espèce en cause sans avoir besoin de recourir aux études ultrastructurales. Récemment, les anticorps monoclonaux contre la paroi des spores de *E. bienewisi* ont été produits et appliqués à la détection du parasite dans les selles des patients infectés (Accoceberry, Thellier *et al.* 1999). En 2002, Alfa Cisse *et al.* ont comparé différentes techniques de diagnostic de *E. bienewisi* et *E. intestinalis*, sur des patients VIH, au Mali (Alfa Cisse, Ouattara *et al.* 2002). Ils ont démontré la fiabilité des anticorps monoclonaux par rapport à la PCR et la coloration à l'Uvitex2B. De plus la détection par IFAT (Immunofluorescent antibody test), s'est avérée moins coûteuse et plus rapide. Cette technique pourrait donc être utilisée en routine pour la détection des microsporidies (Garcia 2002).

#### IV.4.4. Tests sérologiques

La sérologie est encore peu praticable pour le diagnostic spécifique en raison de la réactivité croisée entre espèces du genre *Encephalitozoon*, de la présence d'anticorps chez les sujets asymptomatiques et de l'altération de la réponse anticorps chez les sujets immunodéprimés. Plusieurs méthodes sérologiques (ELISA, WB...) ont été cependant établies pour détecter les Ac IgM et IgG de microsporidies. Enfin, elles restent inapplicables à la détection d'*Enterocytozoon bieneusi*, dont les infections expérimentales sont inexploitablement pour la production d'antigènes (Desportes-Livage and Datry 2005).

Récemment, un test d'agglutination directe a été mis au point, mais seulement pour la détection de *E. cuniculi*, avec des réactions croisées notamment avec *E. intestinalis*. Cette technique n'est pas utilisable pour des espèces non cultivables comme *E. bieneusi* (Jordan, Zajac *et al.* 2005).

#### IV.4.5. Culture cellulaire et modèle animal

Plusieurs lignées de cellules ont été utilisées pour la culture de microsporidies (cellules de rein de singes ou de lapin, fibroblastes de poumon de fœtus humain ...).

Dans le but d'obtenir une culture de *E. bieneusi*, van Gool *et al.* (van Gool, Canning *et al.* 1994) ont inoculé des cultures de cellules avec des échantillons de selles de patients atteints de microsporidies à *E. bieneusi*, confirmés par biopsies. Aucune culture de *E. bieneusi* n'a pu être mise en évidence, et *E. intestinalis* a pu être isolé. Ceci est probablement dû à la co-infection *E. bieneusi* et *E. intestinalis* chez certains patients. *E. intestinalis* est cultivable, contrairement à *E. bieneusi*. Les cellules HLF ont permis le maintien en culture d'*E. bieneusi* pendant quelques semaines, même si un modèle viable à long terme n'a pu être proposé (Visvesvara, Leitch *et al.* 1995). Plusieurs facteurs rentrent en compte pour la réalisation de cultures de *E. bieneusi* : la virulence de l'inoculum, le nombre suffisant de spores, une lignée cellulaire réceptive, le développement intracellulaire du parasite (vacuole parasitophore) (Visvesvara 2002).

#### IV.4.6. Biologie moléculaire

Comparées aux autres eucaryotes, les microsporidies ont un petit génome, souvent de l'ordre de grandeur de celui des bactéries (de 5.3 à 19 Mb). Bien que les microsporidies

soient de vrais eucaryotes avec un noyau, une membrane intracytoplasmique, et une séparation des chromosomes par fuseaux mitotiques, les gènes de l'ARNr possèdent des caractères des procaryotes. Ils sont composés d'une petite sous unité (16S) de l'ARNr et d'une grande sous unité (23S) de l'ARNr séparée d'un espace intergénique non transcrit (ITS), régions non codantes hypervariables.

Le séquençage de différents gènes chez plusieurs microsporidies parasites de l'Homme, a permis l'application de la PCR au diagnostic des microsporidioses humaines (Franzen and Muller 1999; Weiss 2000). Divers couples d'amorces ont ainsi été sélectionnés pour détecter et identifier les microsporidies dans les échantillons cliniques provenant des patients. Ces amorces ont pour cible essentiellement des séquences du gène codant pour l'ARNr de la petite sous unité des ribosomes (ARNr 16S) (Franzen and Muller 1999), ces gènes possèdent des séquences en acides nucléiques spécifiques d'espèces, et plus rarement des séquences localisées au niveau de la région intergénique (séquence ITS) ou du gène de l'ARNr de la grande sous unité ribosomale (ARNr 23S). Certaines amorces sont spécifiques d'une seule espèce, tandis que d'autres détectent indifféremment toutes les microsporidies du genre *Encephalitozoon* ou bien sont universelles et amplifient l'ADN de la plupart des microsporidies (Weiss and Vossbrinck 1998; Franzen and Muller 1999; Weiss 2000).

La technique de PCR est applicable au diagnostic et à l'identification d'*E. bienewisi* et *E. intestinalis* à partir de prélèvements humains et s'avère être une méthode sensible, spécifique et reproductible. Le diagnostic d'espèce à partir des selles permet d'éviter aux patients des examens invasifs pénibles. L'automatisation de cette technique permettrait son utilisation en routine dans de nombreux laboratoires de parasitologie, évitant le recours à la microscopie électronique pour l'identification d'espèce qui reste indispensable pour orienter le traitement. Son seuil de détection est de  $10^2$ - $10^3$  spores/g de selles. (Rinder, Janitschke et al. 1998). Cette méthode peut également représenter un bon outil pour les études épidémiologiques notamment de prévalence en permettant la détection d'infections subcliniques.

**Le diagnostic des microsporidioses est particulièrement difficile. Il repose sur la mise en évidence des spores dans les prélèvements biologiques, en particulier les selles. Les techniques les plus employées sont les colorations, notamment l'IF et le trichrome modifié. A l'origine, seule la microscopie électronique permettait d'affirmer le diagnostic d'espèce. Les nouvelles techniques de diagnostic reposent actuellement sur la biologie moléculaire et les anticorps monoclonaux.**

Techniques		Sensibilité	Spécificité	Caractéristiques	
Microscopie	Electronique	+	+++++	Identification basée sur l'ultrastructure	
	Optique	Colorations classiques	+	+	Pas suffisamment performant
		Trichrome simple	++	++	Facile, rapide
		Trichrome Weber	+++	++++	Meilleure spécificité
		Fluorochromes	++++	++	Nécessite microscope à fluorescence
		Gram	?	+++	
Recherche d'antigènes	<i>E. intestinalis</i>	++	++++	Sérum spécifique, fluorescence verte	
	<i>E. bienewisi</i>	++	+	Pas de sérum spécifique	
Recherche d'anticorps		-	-	Pas d'intérêt car il s'agit de patients ID	
PCR		++++	++++	Problème d'application en routine	

**Tableau IV. Caractéristiques comparées des différentes techniques diagnostiques des microsporidioses humaines (Bettens, Gigi et al. 1999)**

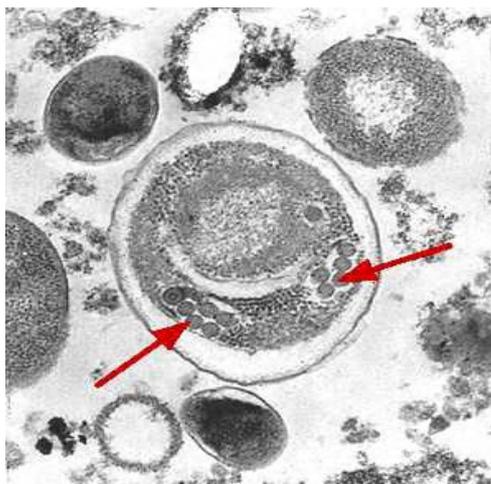


Figure 11. Spore de *E. bienewisi* en microscopie électronique X1000. Les flèches indiquent l'enroulement double du tube polaire caractéristique de l'espèce (Center for Disease Control 2005)

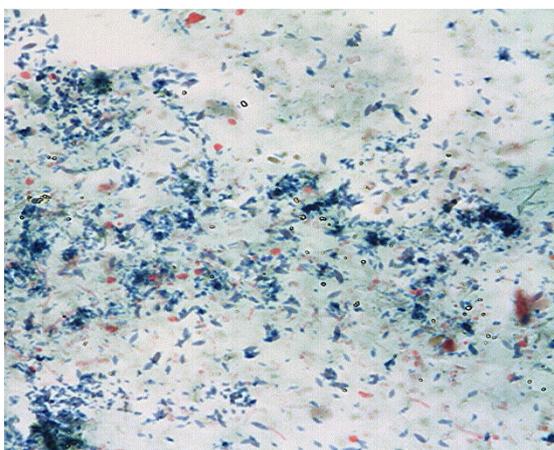


Figure 12. Spores d' *E. bienewisi* dans les selles d'un patient infecté par le VIH. Coloration au trichrome modifié (objectif X100). Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Nantes

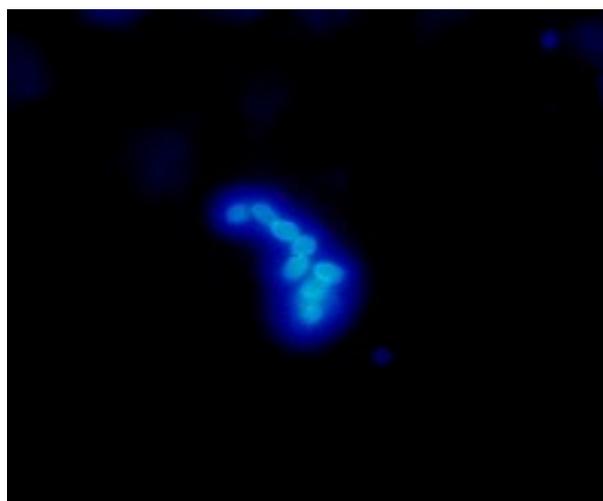


Figure 13. Spores d' *E. bienewisi*, coloration à l'Uvitex 2B, microscope à fluorescence, objectif X100, filtre 365nm (Franzen and Muller 2001)

#### IV.5. Traitement

Le traitement des microsporidioses intestinales reste un des problèmes majeurs posés par cette infection. Si les sujets immunocompétents peuvent guérir spontanément, un traitement efficace est indispensable pour les patients immunodéprimés présentant une diarrhée chronique. Là encore, les deux espèces intestinales manifestent des différences dans leur sensibilité vis-à-vis des traitements antimicrosporidiens proposés. Au cours des infections sévères chez les patients atteints de SIDA, et parfois chez les sujets immunocompétents, un traitement symptomatique de la diarrhée et des troubles digestifs est nécessaire. Les ralentisseurs de transit sont utilisés afin de contrôler la perte liquidienne et d'améliorer le confort du patient, mais leur efficacité reste limitée.

Les options thérapeutiques pour le traitement des microsporidioses sont peu nombreuses. Diverses molécules potentiellement actives ont été testées au cours des dernières années, mais très peu ce sont montrées efficaces.

*E. bienewisi*, espèce la plus fréquente, reste la plus difficile à traiter entre autre par son mode de développement et de multiplication à l'intérieur même du cytoplasme de la cellule hôte, sans vacuole parasitophore.

##### IV.5.1. Thérapies courantes

- L'albendazole (Zentel<sup>®</sup>) est ainsi couramment utilisée dans le traitement des microsporidioses intestinales dues à *E. intestinalis* (Dore, Marriott *et al.* 1995; Molina, Oksenhendler *et al.* 1995; Molina, Chastang *et al.* 1998). *In vitro*, cette molécule est connue pour inhiber la polymérisation de la tubuline, constituant du fuseau mitotique, et bloque la division du parasite (Didier 1997). Le traitement est de 21 jours, à raison de deux prises de 400mg par jour ; il ne nécessite pas de précautions particulières. Les benzimidazoles ne sont pas actifs sur *E. bienewisi*. (Figure 14)

- *E. bienewisi* est sensible à la fumagilline et ses dérivés (Molina, Goguel *et al.* 1997). La fumagilline, produit par *Aspergillus fumigatus*, est un antibiotique utilisés par les apiculteurs pour lutter contre la nosématose de l'abeille (propriétés anti-angiogéniques). Les patients traités avec cet antibiotique éliminent en effet rapidement et de façon durable *E. bienewisi* (Molina, Goguel *et al.* 2000; Molina, Tourneur *et al.* 2002). La fumagilline se prescrit à la dose de 60 mg par jour pendant 14 jours (Fumabil B<sup>®</sup>, 70µg/mL de concentration finale de fumagilline). Son utilisation est cependant limitée

par ses effets indésirables toxiques mais réversibles, qui se manifestent entre autre par une chute plus ou moins sévère des plaquettes chez les sujets traités.

- Le TNP-470 (AGM 1470), antitumoral, constitue une des alternatives à la fumagilline; lors de test *in vitro*, cet analogue synthétisé à partir de la fumagilline et de l'ovacilline, s'est en effet révélé moins toxique et tout aussi efficace vis-à-vis de nombreuses espèces de microsporidies infectant l'homme (Didier 1997; Coyle, Kent et al. 1998).

- Traitement antirétroviral actif : Les traitements antirétroviraux ont montré un effet bénéfique sur la réduction des infections opportunistes et en particulier les microsporidies (Lafaurie, Sarfati et al. 2003)

Chez les patients traités, on observe une négativation des examens des selles et des biopsies intestinales. (Conteas, Berlin et al. 1998; Dascomb, Clark et al. 1999; Maggi, Larocca et al. 2000). Les pays où la multithérapie anti-rétrovirale est disponible depuis 1995/1996, la prévalence des microsporidies chez les patients infectés par le VIH a considérablement diminué (Conteas, Berlin et al. 1998; Weber, Ledergerber et al. 1999)

#### IV.5.2. Autres traitements rapportés

- L'atovaquone a montré une activité variable contre les microsporidies. Dans une étude, des patients SIDA atteints de microsporidies intestinales avec diarrhées et douleurs abdominales ont eu une diminution de leurs symptômes après administration d'Atovaquone par voie orale (250 mg, 3 fois par jours, pendant 1 mois ou plus), cependant aucune diminution de la charge parasitaire ni dans les selles, ni dans les biopsies n'a été observée (Anwar-Bruni, Hogan *et al.* 1996)

- La clindamycine a été utilisée avec de bons résultats sur un patient VIH atteint de nodules cutanés dus à *Encephalitozoon*. Les nodules se sont spontanément résorbés après 300 mg toutes les 6 heures, pendant un an (Kester, Turiansky *et al.* 1998)

- La furazolidone est une nitrofurane synthétisée, active sur les bactéries Gram positif et négatif aussi bien que sur les protozoaires. Des patients VIH, atteints de microsporidies ont reçu 100 mg, 4 fois par jours, pendant 3 ans. Une rémission des diarrhées et une diminution de l'excrétion des spores ont été montrées (Dionisio, Sterrantino *et al.* 1995). Les biopsies intestinales ont montré une morphologie anormale de tous les stades d' *E. bienewisi* (Dionisio, Manneschi *et al.* 1997).

- Des résultats variables ont été rapportés sur l'efficacité de l'itraconazole dans le traitement des microsporidioses. Aucun effet n'a été observé sur le traitement de patients SIDA atteints de kératoconjunctivites dues à *Encephalitozoon spp.* ou infections intestinales dues à *E. bienewi* (Albrecht, Stellbrink *et al.* 1995; Molina, Goguel *et al.* 1997). L'association de l'albendazole et de l'itraconazole est cependant efficace pour le traitement de *B. vesicularum* et *Encephalitozoon* (Albrecht, Stellbrink *et al.* 1995; Cali, Takvorian *et al.* 1998). Chez les sujets non-HIV, le traitement reste l'itraconazole par voie orale (Sridhar and Sharma 2003).

In vitro, l'itraconazole inhibe l'extrusion du filament polaire chez *E. hellem* (Leitch, He *et al.* 1993).

- Le métronidazole est un nitroimidazole, a donné occasionnellement des résultats, mais des rechutes sont fréquentes (Canning and Hollister 1990; Eeftinck Schattenkerk, van Gool *et al.* 1991; Sun, Kaplan *et al.* 1994; Brasil, Sodre *et al.* 1996; Kotler and Orenstein 1998; Gumbo, Hobbs *et al.* 1999)

- Le nitazoxanide, anti parasitaire à large spectre, s'est avéré efficace dans le traitement d'un cas de microsporidiose intestinale causé par *E. bienewi* (Bicart-See, Massip *et al.* 2000). Dans l'unique cas traité, la dose prescrite fut de 1000 mg par jour, 60 jours consécutifs.

- Le thalidomide inhibe le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) produit par les macrophages. Une élévation du TNF a été décrite dans les selles de patients SIDA, atteints de microsporidioses. A l'heure actuelle, aucune étude n'a pu établir un rôle spécifique au Thalidomide dans l'infection à microsporidie.

- Les « Bloqueurs » de calcium (inhibiteurs). Le calcium rentre dans le processus de germination des microsporidies. L'addition de nifédipine (inhibiteur de calcium) à des concentrations nanomolaires, inhibe, in vitro, la germination de *E. hellem* et *E. intestinalis* (Leitch, He *et al.* 1993; He, Leitch *et al.* 1996). Cela suggère donc l'importance du potentiel membranaire dans l'extrusion du filament polaire. Il n'existe actuellement pas d'étude sur des patients séropositifs pour VIH.

- La nikkomycine Z, un inhibiteur compétitif de la chitine synthase, inhibe, in vitro, la réplication de *E. hellem* et *E. cuniculi* (Bigliardi, Bernuzzi *et al.* 2000).

- Le lufenuron (Program®, Novartis) a été utilisé pour contrôler les infections fongiques chez les animaux par inhibition de la chitine synthase. Il a montré une inhibition de 60% à la fois de *E. intestinalis* et *Vittaforma corneae*.(Didier, Maddry *et al.* 1998)

- Les analogues des polyamines. Ils s'accrochent à l'ADN, la chromatine, et l'ARN et affectent le noyau et la division cellulaire. Les analogues inhibent le transporteur spécifique de polyamines et la réplication.

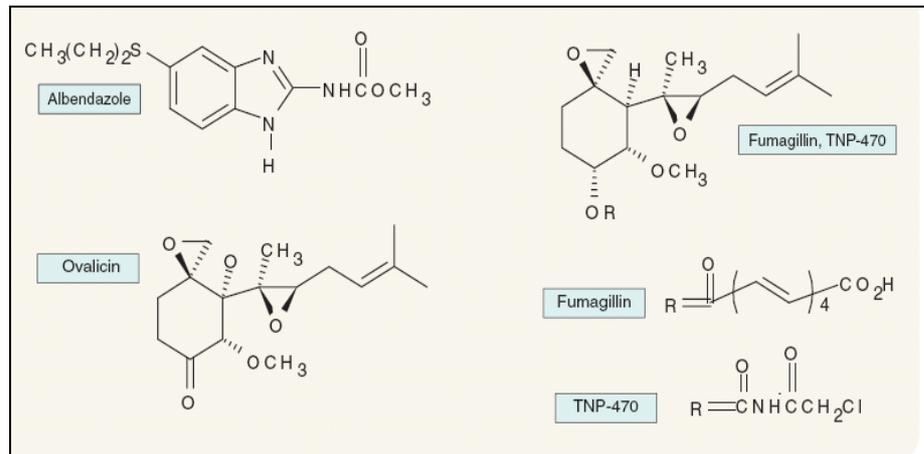


Figure 14. Structure des principales molécules utilisées en thérapeutique

Espèces	Site de l'infection	Traitement
<i>Brachiola algerae</i>	Cornée, muscle	Non rapporté
<i>Brachiola connori</i>	Systémique	Non rapporté
<i>Brachiola vesicularum</i>	Muscle	Albendazole (oral, 400 mg 2fois/jour) et itraconazole (oral, 400 mg une fois/jour)
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	Intestin, bile...	Fumagilline (oral, 20 mg 3 fois/jour pendant 2 semaine) ou restauration immunitaire (antirétroviraux)
<i>Encephalitozoon spp.</i> <i>E. cuniculi</i> , <i>E. hellem</i> , <i>E. intestinalis</i>	Systémique Cornée	- Albendazole (oral, 400 mg 2 fois/jour pendant 3–4 semaines) - Fumagilline (local, 70 µg/ml, 2 gouttes toutes les 2heures pendant 4 jours et ensuite 2 gouttes 4fois par jour)
<i>Microsporidium africanum</i>	Cornée	Non rapporté
<i>Microsporidium ceylonensis</i>	Cornée	Non rapporté
<i>Nosema ocularum</i>	Cornée	Non rapporté
<i>Pleistophora ronneafiei</i>	Muscle	Non rapporté
<i>Trachipleistophora anthropoptera</i>	Systémique Cornée	Non rapporté Non rapporté
<i>Trachipleistophora hominis</i>	Muscle Cornée	- Albendazole (oral, 400 mg 2fois/jour), sulfadiazine (oral, 1 g, 4 fois/jour) <sup>¶</sup> , pyriméthamine (oral, 50 mg/jour) et acide folinique (oral, 7.5 mg/jour) - Albendazole (oral, 400 mg 2 fois/jour pendant 3–4 semaines) et fumagilline (local, 70 µg/ml, 2 gouttes tous les 2 heures pendant 4 jours ensuite 2 gouttes, 40fois/jour)
<i>Vittaforma corneae</i>	Cornée Tractus urinaire	- Fumagilline (local, 70 µg/ml, 2 gouttes toutes les 2 heures pendant 4 jours et ensuite 2 gouttes 4 fois par jours) - Albendazole (oral, 400 mg 2 fois/jour pendant 3–4)

**Tableau V. Espèces infectant l'homme et les traitements recommandés (Kotler and Orenstein 1998; Desportes-Livage 2000; Weber, Deplazes *et al.* 2000; Didier, Maddry *et al.* 2005)**

Dans l'infection intestinale à microsporidies, on retrouve principalement *E. bienewisi* et *E. intestinalis*, chez des patients immunodéprimés. L'albendazole donne de très bonnes réponses sur *E. intestinalis*, qui est actuellement la première ligne de traitement, ce qui n'est pas le cas de *E. bienewisi*. Aucun benzimidazole n'a montré de réponse sur *E. bienewisi*. Cependant la fumagilline et le TNP-470 ont montré de très bons résultats cliniques. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour établir des protocoles thérapeutiques et optimiser les traitements. Le meilleur traitement reste actuellement la restauration immunitaire et notamment les multithérapies antirétrovirales pour les patients séropositifs pour le VIH.

**Le traitement des microsporidioses est actuellement limité. Les deux molécules les plus utilisées sont l'albendazole, la fumagilline et son dérivé, le TNP 470. Ces derniers, au contraire de l'albendazole, sont actifs sur *E. bienewisi*, mais présentent une hématotoxicité importante. Le meilleur traitement reste la multithérapie anti-rétroviral et la reconstitution immunitaire.**

#### IV.5.3.Prévention

Les microsporidies sont des parasites ubiquitaires dans l'environnement et restent viables pendant un certain temps. Il n'existe pas de vaccin. Les stratégies de prévention sont alors, l'identification des facteurs de risques, la réduction de l'exposition à l'eau contaminée.



***Partie II***

*Matériels et Méthodes*

## **I. Matériels**

### **I.1. Population étudiée**

Les échantillons analysés dans le cadre de ce travail ont été récoltés au Vietnam (Hanoï et sa périphérie) et au Niger (Niamey). Par ailleurs quelques échantillons provenant de patients hospitalisés aux CHU de Nantes, de Nice et de Vannes ont été inclus à cette étude.

#### **I.1.1. France**

Au CHU de Nantes l'examen parasitologique des selles, pour un patient VIH comprend systématiquement, en plus des techniques traditionnelles, la recherche spécifique des oocystes de cryptosporidies ainsi que les spores de microsporidies. Cette dernière est réalisée grâce aux colorations de Weber et une coloration de van Gool. Tous les échantillons douteux à l'examen microscopique durant la période de l'étude (novembre 2004-août 2005) ont été inclus

Trois échantillons de selles (et urine) provenant du CHU de Nice (Pr. Le Fichoux) et un échantillon du Centre Hospitalier de Vannes ont été également ajoutés à l'étude.

#### **I.1.2. Vietnam**

D'octobre 2004 à août 2005, une étude épidémiologique concernant les microsporidioses intestinales a été conduite à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie à Hanoi (NIHE) (Figure 15). Au total, 213 échantillons de selles de patients admis dans différents hôpitaux ou dispensaires de Hanoï (Dong Da, Bach Mai, Hôpital Mère Enfant de Saint Paul, Institut Militaire et Hôpital Français) et sa région (Bavi) ont été recueillis. Les objectifs initiaux de cette étude devaient porter sur une population de patients séropositifs pour le VIH. Cependant nous avons été confrontés à certaines difficultés de recueil de prélèvements : le refus des patients à recueillir leurs selles par souci culturel et éthique, une méconnaissance des microsporidies, ainsi que la méfiance des infirmières à prélever des selles de patients VIH par méconnaissance des voies de contamination du virus. En effet à 10 mois, seulement 8 % des échantillons provenaient de sujets positifs au VIH, la majorité des patients se composait d'enfants ou d'adultes de statut immunitaire inconnu ou de patients atteints de lupus et sous corticothérapie.

La population étudiée incluait à la fois des adultes et des enfants (moins de 1 an à 75 ans), VIH ou non, avec ou sans diarrhée. Aucun échantillon n'a été exclu de l'étude.

**Nous avons analysé 213 selles de patients diarrhéiques (VIH ou non VIH), d'âge de conditions sociales différentes et de statuts immunitaires le plus souvent inconnus**

### I.1.3.Niger

Au Niger, une étude prospective a été réalisée, à la mise en place de l'INAARV (Initiative Nigérienne pour l'Accès aux Anti-Rétroviraux), pendant 10 mois (novembre 2004 à août 2005) sur des patients, adultes et enfants, séropositifs pour le VIH suivis dans les différents centres prescripteurs d'AntiRétroViraux (ARV) de Niamey : l'Hôpital National de Niamey, CTA (Centre de Traitement Ambulatoire). Tous les patients VIH, souffrant ou non de diarrhée et ayant donné leur consentement, suivis dans l'un des 4 centres prescripteurs d' ARV de Niamey ont été inclus. Tous les patients VIH négatif ou positif mais n'ayant pas donné leur consentement ont été exclus. 19 patients étaient déjà sous traitement anti-rétroviral au moment de l'inclusion.

**De novembre 2004 à août 2005, 228 patients séropositifs pour le VIH, pris en charge au Centre de Traitement Ambulatoire de Niamey ou hospitalisés à l'Hôpital National de Niamey ont été inclus dans le cadre de l'INAARV.**

## **I.2. Natures des prélèvements**

L'analyse a été conduite exclusivement sur des échantillons de selles. Tous les prélèvements recueillis ont été conservés à +4°C durant toute la durée de l'étude. La quantité minimum nécessaire était d'environ 2 g environ, pour la réalisation de frottis et l'extraction d'ADN pour l'analyse moléculaire.



**Figure 15. Laboratoire : Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie, Hanoï. Vietnam**

## **II. Méthodes**

### **II.1. Dépistage**

Un examen direct macroscopique (aspect et consistance) et microscopique a été réalisé de manière systématique pour chaque échantillon.

En microscopie, toutes les selles ont été examinées après coloration de frottis sur lames pour la recherche des spores de microsporidies. Ce dépistage des patients porteurs de microsporidies intestinales a été réalisé, sur le terrain, à Niamey ainsi qu'à Hanoï. Une relecture en double aveugle a été effectuée à Nantes pour les selles du Niger.

Deux techniques de colorations complémentaires ont été utilisées (Annexe 2 et 3) :

- Coloration de Weber (trichrome modifiée) et lecture au microscope classique objectif x100 à l'immersion.

- Coloration de van Gool (UVIBIO LDBIO Diagnostics, fluorochrome à affinité sélective pour la chitine qui permet une recherche rapide des Microsporidies dans les selles par la technique à l'UVITEX 2B (van Gool, Snijders et al. 1993)) et lecture au microscope à fluorescence objectif x100 en UV, filtre d'excitation 355 à 425 nm.

L'absence de spores de microsporidies dans les selles n'a été admise qu'après un temps de lecture d'au moins 10 minutes. Afin de vérifier la qualité de la coloration, un témoin positif a été incorporé dans chaque série de coloration.

Tous les échantillons positifs ou douteux par les techniques de coloration ont été étudiés par biologie moléculaire.

La coloration de Weber n'a pas été réalisée pour tous les échantillons du Niger.

**Le dépistage de selles a été réalisé sur le terrain par deux techniques de coloration : immunofluorescence (van Gool) et trichrome modifié de Weber. Les échantillons douteux ou positifs ont été analysés par biologie moléculaire.**

## **II.2. Confirmation : Diagnostic moléculaire**

### II.2.1. Extraction de l'ADN

L'extraction a été réalisée grâce au coffret du commerce QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant (Annexe 4). Un témoin d'extraction (eau distillée) a été incorporé à chaque série d'extraction, pour éliminer une éventuelle contamination. Tous les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C.

Afin de valider la technique, nous avons procédé à l'extraction d'un échantillon de selle positive à *E. bienewisi* conservée au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes. Cet extrait a été utilisé comme témoin positif pour le début de notre étude.

### II.2.2. PCR temps réel dans le diagnostic des microsporidioses intestinales

#### II.2.2.1. Principe de la PCR temps réel

La réaction d'amplification de la séquence d'ADN cible comporte les mêmes étapes que la PCR classique (dénaturation, élongation, extension). A la différence de la PCR traditionnelle, la technologie de PCR temps réel repose sur la détection et la quantification en temps réel d'un composé fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. De multiples technologies sont disponibles (SybrGreen, *TaqMan*, FRET, Molecular Beacons...).

#### II.2.2.2. Principe de la méthode *TaqMan*

Dans la PCR temps réel utilisant la technologie *TaqMan*, la sonde est un oligonucléotide linéaire marqué à ses extrémités par deux composés : un *Reporter* (fluorophore donneur) traditionnellement en 5', et un *Quencher* en 3' (fluorophore accepteur). Chaque fluorochrome est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation et

d'émission qui lui est propre. Le reporter, lorsqu'il est excité, transfère son énergie au *quencher*, par le principe de FRET (Transfert d'énergie par résonance de fluorescence). Comme leurs spectres d'émission et d'absorption ne se chevauchent pas (Tableau VI), le fluorophore accepteur absorbe l'énergie qui lui est transmise, mais n'émet aucune fluorescence. Au cours de la synthèse du brin complémentaire, la *Taq*Polymérase digère la sonde provoquant la séparation des deux fluorophores interrompant le FRET. Cette séparation entraîne une fluorescence durant la phase d'élongation (Figure 16). Le TAMRA, longtemps utilisé dans la chimie Taqman est peu à peu été remplacé par une deuxième génération de *quencher* qui présentant l'avantage de ne pas avoir de fluorescence propre (Black Hole Quenchers, Deep Dark Quencher). Cette technique, de plus en plus développée, présente l'intérêt de se dérouler en tubes fermés, un gain de temps considérable par rapport à la PCR traditionnelle. Il en résulte donc une diminution du risque de contamination post-PCR, aucune manipulation post-amplification n'étant nécessaire. (Poitras and Houde 2002; Tse and Capeau 2003)

Spectre	Longueur d'onde (nm)
d'émission de FAM	495-520
d'excitation de TAMRA	555-576

Tableau VI. Propriétés spectrales du FAM et du TAMRA

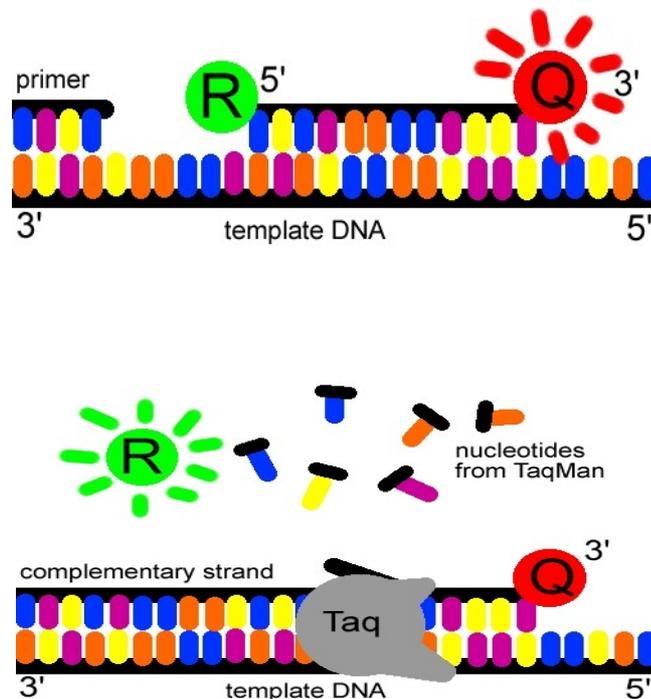


Figure 16 Principe de la PCR temps réel basée sur la technologie *TaqMan*. La sonde marquée de part et d'autre par un *Reporter* et un *Quencher* est clivée par l'ADN polymérase lors de l'élongation. L'éloignement des deux fluorochromes provoque une émission de fluorescences.

**Le principe général de la PCR repose sur l'utilisation de sondes ou d'intercalants fluorescents. Le principe *TaqMan* utilise le système FRET avec un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur.**

### II.2.2.3. RotorGene 3000® (Corbett Research)

Toutes les amplifications ont été réalisées sur le RotorGene 3000® (CORBETT RESEARCH). Cet appareil, utilisant la technologie de PCR en temps réel se compose de deux parties :

- un thermocycleur dont la capacité d'analyse varie de 36 à 72 échantillons (microtubes de 0,2 ou 0,1 mL), grâce à un système de courroies interchangeables. Les variations de température sont assurées par un système à air pulsé qui autorise de très grandes variations de température en un minimum de temps (environ 30 secondes pour passer de 55 à 95°C et inversement) (Figure 17 et 18). La combinaison de l'air pulsé et des mouvements du rotor permet une bonne homogénéisation de la température dans tous les tubes.

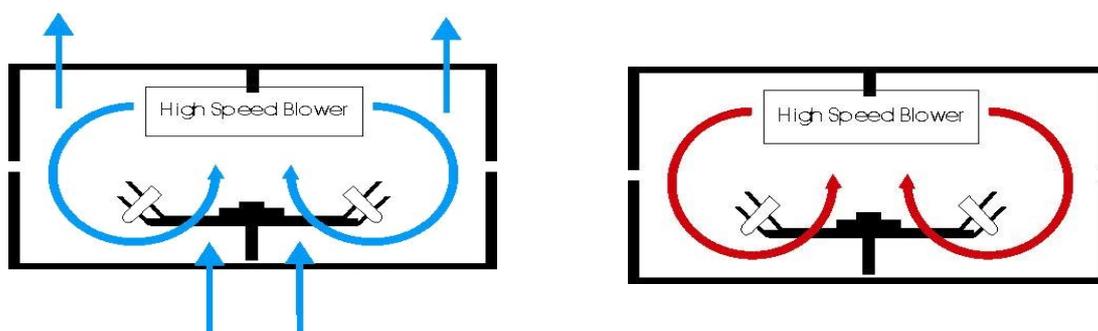


Figure 17. Représentation des mécanismes de chauffage/refroidissement de l'enceinte. Durant le refroidissement, les échantillons sont soumis à une rotation (500 à 1000 rpm) afin de faciliter les transferts thermiques.

- Un système de mesure de la fluorescence, composé de 4 sources lumineuses excitatrices, de type LED (Light Emitting Diode), dont les longueurs d'ondes d'émission sont respectivement de 470, 530, 585 et 625 nm (Figure 19). Les LED présentent l'avantage d'avoir un spectre d'émission extrêmement étroit, ainsi qu'une durée de vie importante. La détection est assurée par un photomultiplicateur et 6 filtres réalisant 6 canaux de détection.

La plupart des fluorophores seront donc détectés : SYBR-Green I, 5-FAM, 6-FAM, JOE, VIC, Cy3, Cy5, ou bien le Red 640.

Le Rotor-gene 3000 s'applique aussi bien à la technologie SYBR-green qu'au Taqman, au FRET ou bien encore à des technologies plus complexes, comme les molecular beacons. Le « multiplexage » est également possible, grâce aux différents canaux. Enfin, l'apport des courbes de fusion ou « melting curves » permet l'analyse des SNP (single nucleotide polymorphism). Les domaines d'applications sont donc extrêmement variés.

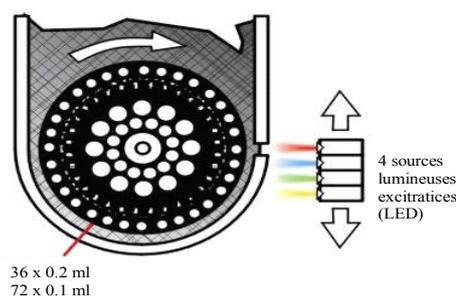


Figure 18. Vue du dessus de la chambre de chauffage/refroidissement. Le rotor tourne dans le sens de la flèche. La position des canaux d'émission et de détection est également représentée.

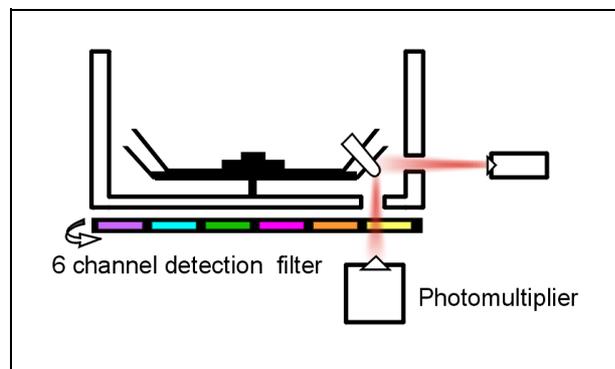


Figure 19 Vue de profil du rotor montrant la position d'un tube témoin, de l'incidence de la source d'émission et la position du filtre de détection de 6 canaux au-dessus du détecteur de fluorescence.

#### II.2.2.4. Interprétation

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des « amorces ». L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde. (Figure 20). La courbe peut être divisée en 2 phases. La première phase correspondant à l'amplification est exponentielle. La quantité de produit de PCR obtenue à chaque moment de cette phase est directement fonction du

nombre de copies initiale du fragment d'ADN à amplifier. En revanche la phase en plateau correspond à un ralentissement de l'amplification.

La première phase est facilement modélisable.

Soit : - $N_0$  : le nombre de copies initiales  
 - $N_c$  : le nombre de copie au cycle  $c$   
 - $E$  : l'efficacité de la PCR

}  $N_c = N_0 \cdot (1+E)^c$ , si  $E=100\%$   
 $N_c = N_0 \cdot 2^c$

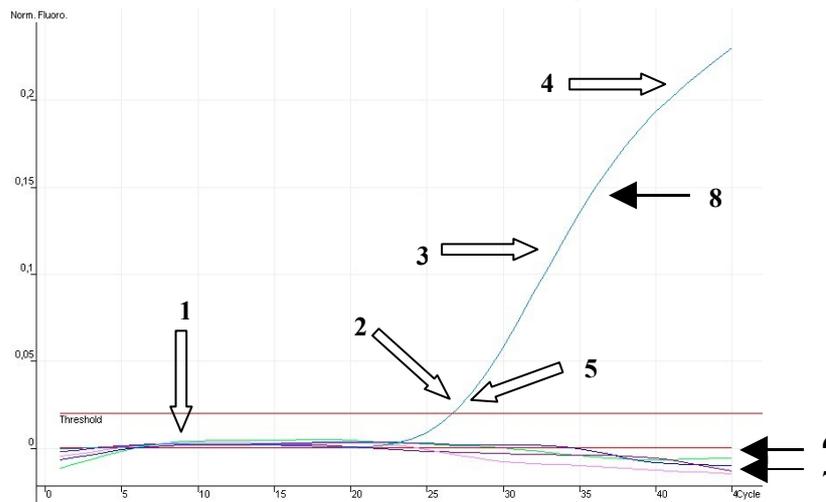


Figure 20. Cinétique de la PCR temps réel

- 1 : Ligne de base
- 2 : Phase exponentielle de la PCR
- 3 : Phase linéaire de la PCR
- 4 : Phase de saturation
- 5 : Cycle seuil (Threshold)

L'axe des abscisses correspond aux cycles de la PCR. L'axe des ordonnées correspond à la quantité du produit amplifié.

A chaque PCR, on fixe un arbitrairement un *threshold* ou ligne seuil (0,02 pour nos deux PCR) correspondant à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au dessus du bruit de fond. Le point d'intersection entre la courbe

d'amplification et cette ligne seuil est appelé Ct (cycling threshold ou cycle seuil). Le Ct correspond au nombre de cycles d'amplification à partir duquel l'échantillon est considéré comme positif. Si des dilutions successives sont effectuées, il est possible d'obtenir des courbes d'amplification décalées successivement vers la droite et dont les Ct sont successivement augmentés d'une valeur constante.

On vérifie la négativité du témoin négatif (6), ainsi que celle des témoins d'extraction des selles (7) testés de la même façon que les échantillons.

On pourra considérer la positivité d'un échantillon si celui-ci a un  $Ct < 40$  (8)

Sur le deuxième canal (VIC), on vérifie l'absence d'inhibiteur dans chacun de nos échantillons, grâce au contrôle interne (IPC). On définit de la même façon les Ct.

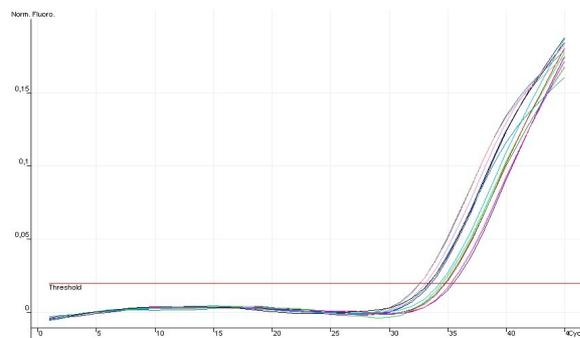


Figure 21. PCR temps réel : Courbe d'amplification du contrôle interne (IPC), ajouté à chaque échantillon de la PCR

**Les résultats sont représentés sous forme d'une courbe sigmoïde et peuvent être suivis en temps réel. Pour un échantillon donné, le résultat s'exprime par le Ct ou cycle seuil correspondant au nombre de cycles d'amplification à partir duquel l'échantillon est considéré comme positif.**

#### II.2.2.5. Conditions de la réaction de PCR temps réel

##### II.2.2.5.1. Les amorces et les sondes

Nous avons utilisé pour chacune des deux espèces (*E. bienersi* et *E. intestinalis*) des sondes et des primers spécifiques, validés dans des travaux antérieurs.

#### II.2.2.5.1.1.PCR spécifique *E. bienersi*

La sonde et les primers pour la recherche de *E. bienersi* avaient déjà été définis au sein du Laboratoire. Le fragment amplifié, d'une taille de 180 pb, correspond à la petite sous-unité de l'ADNr d'*Enterocytozoon bienersi* (SSU). Les amorces, délimitant cette séquence ont été vérifiées sur Primer3, à partir d'une séquence de référence (Génotype A, n° d'accension : AF 024657). Leurs spécificités ont été vérifiées à l'aide du logiciel Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) (Annexe 5). La même démarche a été suivie pour la séquence de la sonde. Elle comporte les fluorochromes FAM en 5' et TAMRA en 3'. Les amorces et la sonde ont été produites par Eurogentec®. (Tableau VII)

Amorces et sonde	Concentrations finales utilisées pour la PCR	Nucléotides	Tm (°C)	Références
Primer EB1	0,3 µM	23	70	Non publié
Primer EB5	0,2 µM	24	70	
Sonde EBS2	0,2 µM	27	84	

Tableau VII. PCR temps réel *E. bienersi* : caractéristiques des amorces et sonde

Forward primer **EB1** : 5'-CGA-CAG-CCT-GTG-TGT-GAG-AAT-AC-3'

Reverse Primer **EB5**: 5'-CAA-CGA-ATG-ACT-TGA-CCC-TGG-TAA-3'

Sonde **EBS2** : 5'-6-FAM-TGC-TTA-ATT-TAA-CTC-AAC-GCG-GGA-AAA-TAMRA-3'

#### II.2.2.5.1.2.PCR spécifique *E. intestinalis*

Nous avons utilisé les amorces et sonde sélectionnées par le Laboratoire de Saint-Louis-APHP (Menotti, Cassinat *et al.* 2003).

Les amorces choisies amplifient un fragment de 127 pb de la petite sous-unité de l'ARNr, entre les positions 988 et 1114 (Genbank n°accension U009929) (Annexe 6 et Tableau VIII)

Forward primer FEI1 : 5'-GCA-AGG-GAG-GAA-TGG-AAC-AGA-ACA-G-3'

Reverse primer REI1: 5'-CAC-GTT-CAG-AGG-CCC-ATT-ACA-CAG-C-3'

Sonde S.INTES : 5'-6-FAM-CGG-GCG-GCA-CGC-GCA-CTA-CGA-TA-TAMRA-3'

Amorces et sonde	Concentrations utilisées pour la PCR	Longueur (pb)	Tm (°C)	Références
FEI1	0,2 µM	25	76 !	(Menotti, Cassinat et al. 2003)
REI1	0,2 µM	25	76	
S.INTES	0,4 µM	23	78	

Tableau VIII. PCR temps réel *E. intestinalis* : Caractéristiques des amorces et sonde

#### II.2.2.5.2. Témoins positifs

Au début de notre étude, nous avons utilisé comme témoin positif, une selle de patients atteints de microsporidioses intestinales, positive à *E. bienewisi*, reçue au CHU de Nantes en 2004.

Pour la suite de notre étude, une selle de patient, vietnamien, VIH, atteint de microsporidiose intestinale à *E. bienewisi* a été utilisée comme contrôle positif d'amplification. Elle nous a parue plus riche en spores, de plus nous disposions d'une quantité plus importante et suffisante pour toute notre étude.

Nous ne disposions pas de contrôle positif pour *E. intestinalis*, nous avons alors fait appel à Mr Menotti et Mme Sarfati (Hôpital Saint Louis-Paris). Ils nous ont fait parvenir trois échantillons de selles positives (confirmé par PCR et anticorps monoclonaux) que nous avons utilisé comme témoins.

Ces échantillons ont été extraits avec QIAamp® DNA Stool Mini Kit, conservés à -20°C. Un témoin négatif d'amplification (eau distillée) a été inclus lors de chaque PCR.

#### II.2.2.5.3. Composants du mélange réactionnel

##### II.2.2.5.3.1. Tampon

Le tampon 10X sert à tamponner le milieu réactionnel au niveau optimal pour l'activité de la Taq DNA Polymérase.

#### *II.2.2.5.3.2.MgCl<sub>2</sub>*

L'ion Mg<sup>2+</sup> est un cofacteur essentiel de la TaqPolymérase. Ce cation bivalent interagit avec les charges négatives de la chaîne d'ADN, limitant ainsi les forces de répulsion entre brins d'ADN et favorisant donc la stabilité de l'hybridation. Plus sa concentration est importante, plus l'hybridation est facilitée que celle-ci soit spécifique ou non. Une trop forte concentration peut alors conduire à une augmentation des signaux non spécifiques.

#### *II.2.2.5.3.3.TaqPolymérase*

La polymérase utilisée est la Platinum® Taq DNA Polymérase (Invitrogen). C'est une Taq Polymérase, « Hot Start » d'origine recombinante.

#### *II.2.2.5.3.4.Contrôle Interne*

IPC ou Internal Positive Control (Exogenous®, AB Systems) est un témoin interne de PCR temps réel. Il permet de contrôler la présence ou non d'inhibiteur dans chaque extrait d'ADN. Le mélange utilisé contient l'IPC Mix 10X (amorces et sonde TaqMan) et l'IPC DNA 50X (cible).

#### *II.2.2.5.3.5.Désoxyribonucléotides triphosphate*

Les nucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dUTP) sont utilisés à une concentration de 200 µM. Des concentrations supérieures risquent d'augmenter le nombre d'erreur d'incorporation. Des concentrations inférieures à 20 µM peuvent en revanche, diminuer le rendement de la réaction d'amplification.

#### *II.2.2.6.Amplification automatisée et cycle de température*

Tous les échantillons ont été testés en double, pour chacune des deux PCR spécifiques. Le système TaqMan utilise des conditions d'amplification en deux étapes : une étape dénaturation et une étape hybridation/élongation, réalisée à une même température.

- 1<sup>er</sup> cycle de température : 95°C pendant 600 secondes (Activation de la Taq « Hot Start »)

- 2° cycle de température (répété 45 fois) :
  - dénaturation à 95°C pendant 15 secondes
  - hybridation et élongation à une température déterminée.

### II.3. Génotypage des échantillons positifs à *Enterocytozoon bieneusi*

Les extraits d'ADN positifs à *Enterocytozoon bieneusi*, par PCR temps réel ont ensuite été amplifiés dans la région ITS à l'aide des amorces MSP3 et MSP4B afin de permettre la classification des différentes souches et la détermination des différents génotypes d' *E. bieneusi*.

#### II.3.1. Amplification

##### II.3.1.1. Le choix des amorces

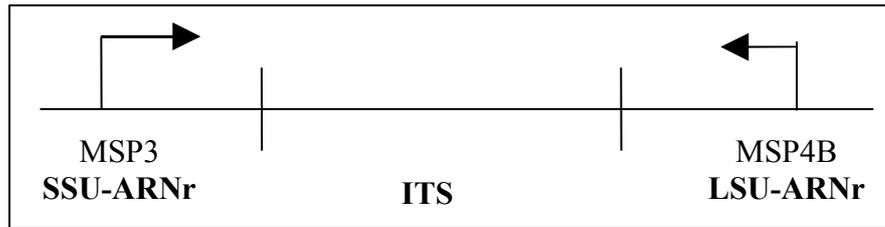
La PCR a été réalisée en utilisant le couple, MSP3/MSP4B conduisant à l'obtention d'un fragment de 508 pb spécifique d' *Enterocytozoon bieneusi*, dont 122 pb en 3' correspondant à la petite sous-unité de l'ARN (SSU-rDNA), 243 pb à la région ITS (intergenic transcribed spacer) et 143 pb, en 5', à la grande sous-unité de l'ARN (LSU-rDNA). (Figure 22). Ces amorces proviennent de différentes publications, notamment celle de Subrungrung *et al.* qui montre une spécificité et une sensibilité de 100% avec ces primers (Subrungrung, Mungthin *et al.* 2004) (Annexe 7)

Amorces	Concentrations utilisées pour la PCR	Tm (°C)	Références
MSP3	1 µM	74	(Katzwinkel-Wladarsch, Lieb <i>et al.</i> 1996)
MSP4B	1 µM	78	

Tableau IX. Génotypage des échantillons positifs à *E. bieneusi* : caractéristiques des amorces

Forward primer **MSP3** : 5'-GGA-ATT-CAC-ACC-GCC-CGT-CRY-TAT -3'

Reverse primer **MSP4B**: 5'- CCA-AGC-TTA-TGC-TTA-AGT-CCA-GGG-AG -3'



**Figure 22.** Représentation schématique de séquence d'ADN d'*Enterocytozoon bienewisi* amplifiée par le couple primer MSP3/MSP4B

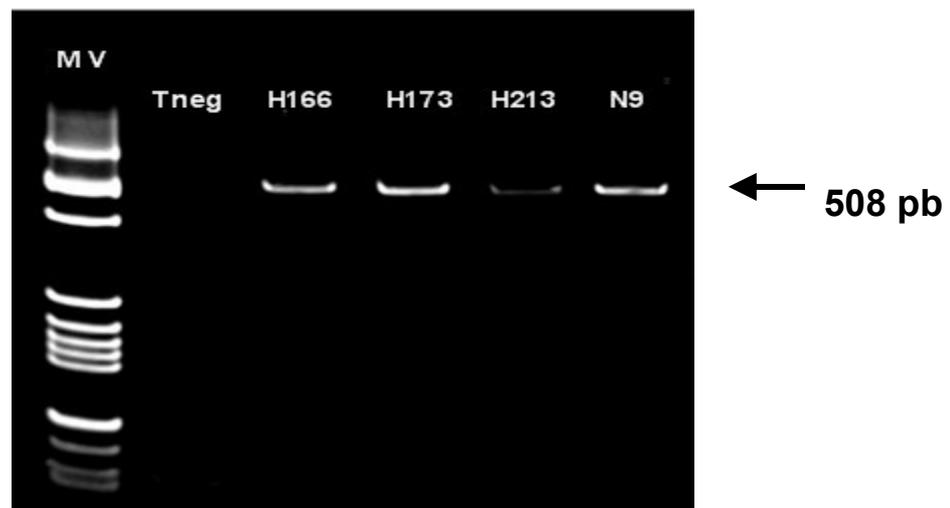
### II.3.1.2. Conditions de l'amplification

Les conditions opératoires sont celles décrites par Katzwinkel-Wladarsch *et al.* en 1996:

- Dénaturation à 94°C, 1 minute
- Phase d'hybridation (ou *annealing*) à 58°C, 1 minute
- Phase d'élongation à 72°C, 1 minute

### II.3.1.3. Migration et visualisation de produits de PCR

Après amplification, les produits de PCR sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 9% et révélés sous UV après passage dans le bromure d'éthidium (Annexe 8). Chaque échantillon positif analysé sera séquencé pour la détermination du génotype. (Figure 23)



**Figure 23. Gel de polyacrylamide 9% Produits de PCR amplifié par des primers MSP3/MSP4B sur trois échantillons de notre étude (H166, H173, H213 et N9). MV : Marqueur V Roche®**

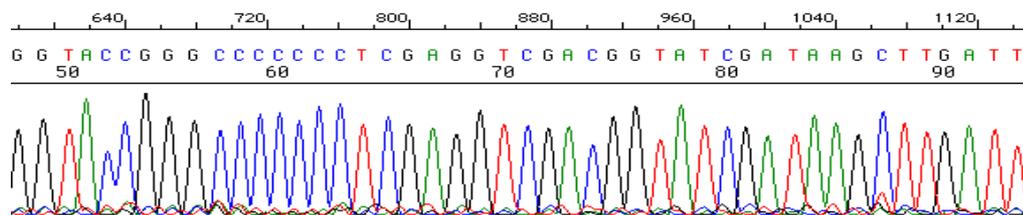
### II.3.2.Séquençage

Le séquençage consiste à déterminer la séquence des nucléotides sur la molécule d'ADN. La méthode utilisée, proposée par Sanger en 1977, repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés didéoxynucléotides (ddNTP), qui bloquent la synthèse d'ADN après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec d'autres nucléotides en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'. Une collection de brins complémentaires, dont la taille diffère d'un nucléotide, est alors présente dans le milieu réactionnel.

#### II.3.2.1.ABI PrismR 3100 (Applied Biosystems)

Pour cette étude le séquençage a été réalisé par un ABI PrismR 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Le segment d'ADN à séquencer est amplifié par PCR (II.4.1). Après purification du produit pour éliminer les nucléotides en excès, les 4 didéoxynucléotides marqués sont mélangés avec différents fluorochromes spécifiques permet de réaliser les quatre réactions dans un seul tube réactionnel. Avec migration capillaire, l'appareil capte les différents fragments d'ADN marqués et les résultats sont acheminés vers un logiciel d'interprétation.

On obtient alors un chromatogramme. Chaque couleur correspondant à un nucléotide : T en rouge, A en vert, G en noir et C en bleu (Figure 24).

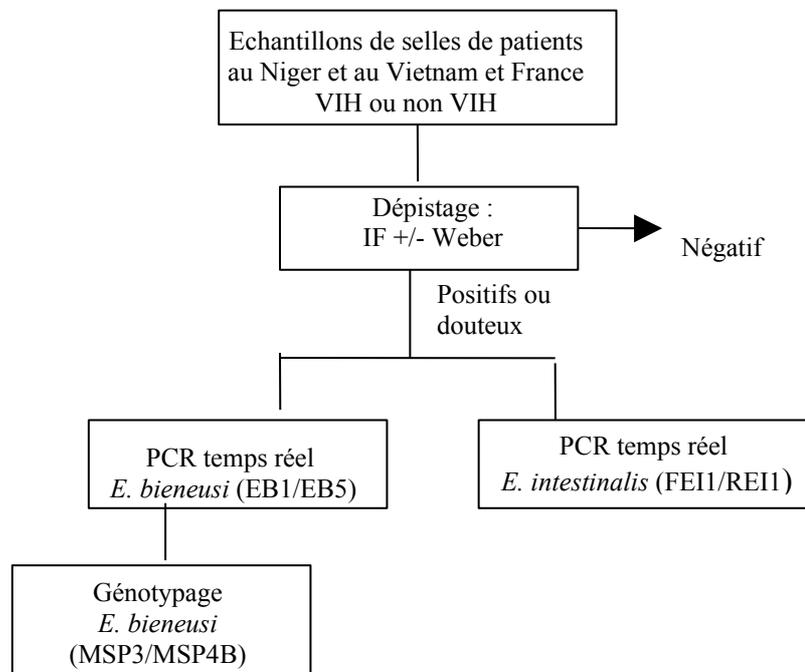


**Figure 24 Exemple de chromatogramme**

#### II.3.2.2.Analyse des Séquences

Les séquences sont ensuite analysés à l'aide de Sequence Navigator® (Applied Biosystems) et les différentes séquences sont ensuite identifiées grâce à deux logiciel : GenBank (Blast) et BIBI (Bio Informatique Bactérielle Identification) <http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/query.php>.

#### II.4. Résumé du protocole mis en place



**Figure 25. Protocole d'étude des échantillons de selles de patients récoltés au Niger, Vietnam et France**

***Partie III***

*Résultats*

## I. Diagnostic moléculaires des microsporidioses intestinales : la PCR temps réel

### I.1. Optimisation des paramètres de la réaction de PCR temps réel

Cette étape vise à déterminer les paramètres d'amplification et la composition du mélange réactionnel pour lesquels la PCR serait optimale. Les conditions seront d'autant meilleures que les Ct sont faibles, valeur qui correspond à l'intersection de la courbe de fluorescence avec un axe seuil défini arbitrairement (threshold, égal ici à 0,02). Ceci nous a permis de comparer les Ct entre-eux, pour chaque PCR temps réel à la fois pour l'optimisation des paramètres de la réaction et pour les critères de validations (sensibilité, spécificité, répétabilité, reproductibilité).

#### I.1.1.PCR *Enterocytozoon bieneusi*

La technique ayant déjà été optimisée et utilisée en routine au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, une nouvelle mise à jour serait inutile. Nous avons utilisé le protocole actuellement en cours : GBEA MO-TEC 113. (Annexe 9)

#### I.1.2.PCR *Encephalitozoon intestinalis*

##### I.1.2.1.Détermination des conditions d'amplification

Au cours de ces différents essais nous avons utilisé un de nos trois témoins positifs *E. intestinalis* fourni par Dr Menotti - Hôpital Saint Louis - Paris (le n° 691)

##### I.1.2.1.1.Détermination de la concentration optimale en MgCl<sub>2</sub>

Quatre différentes concentrations de MgCl<sub>2</sub> ont été testées. L'activité de la Taq polymérase est particulièrement sensible à la concentration en Mg<sup>2+</sup>. Celui-ci favorise l'hybridation. Les résultats sont présentés dans le tableau X. Chaque concentration d'MgCl<sub>2</sub> a été testée quatre fois dans la même réaction.

	Cycling threshold (Ct) en fonction de la concentration en MgCl <sub>2</sub>			
	6mM	5mM	4mM	3mM
Test 1	31.67	31.41	32.35	34.13
Test 2	31.73	31.16	32.48	34.23
Test 3	31.07	31.63	32.05	36.51
Test 4	30.83	31.62	31.42	33.52

**Tableau X. Résultats de l'optimisation des conditions de la PCR en temps réel, concentration en MgCl<sub>2</sub>.**

Les meilleurs résultats sont obtenus avec une concentration de 6 mM puisque les Ct correspondants sont les plus faibles.

**La concentration optimale en MgCl<sub>2</sub> est de 6mM**

#### I.1.2.1.2. Température d'hybridation et d'élongation

Nous avons testé sur un même mix, avec le même échantillon positif, trois températures d'hybridation-élongation. Nous avons testé 60°, 63° et 65°C. Tableau XI et Annexe 10

	Cycling threshold (Ct) en fonction de la température									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Test 60°C	37.15	36.78	35.54	36.66	36.09	36.25	36.28	37.01	35.96	37.96
Test 63°C	32.18	32.22	32.12	32.76	32.11	32.49	32.18	32.37	32.25	32.71
Test 65°C	37.04	36.26	35.85	35.92	36.86	35.68	36.53	34.71	36.46	35.41

**Tableau XI Résultats de l'optimisation de la PCR temps réel en fonction de la température d'élongation hybridation**

Les Ct retrouvés sont plus faibles à 63°C.

**La température optimale d'hybridation et d'élongation est de 63°C.**

**I.1.2.2. Conditions définitives**

Les différentes manipulations réalisées au cours de la mise au point de la technique nous ont permis de déterminer la composition optimale du milieu réactionnel. (Annexe et )

**I.2. Validation de la technique****I.2.1. Sensibilité**

La sensibilité de la méthode est représentée par la plus faible dilution de spores donnant lieu à une amplification dans 100% des expériences.

Compte-tenu de l'impossibilité de cultiver *E. bieneusi* et de la difficulté à mesurer de façon précise le nombre de spores contenues dans les échantillons, la détermination de la sensibilité de la technique n'a pu être réalisée. Une approche par clonage d'un produit de PCR *E. bieneusi*, et la réalisation d'une gamme de dilution de ce plasmide pourrait être envisagée. La littérature rapporte cependant des PCR quantitative *E. bieneusi*, mais les concentrations n'étaient qu'approximatives, utilisant uniquement la microscopie optique (Mungthin, Subrungruang et al. 2005).

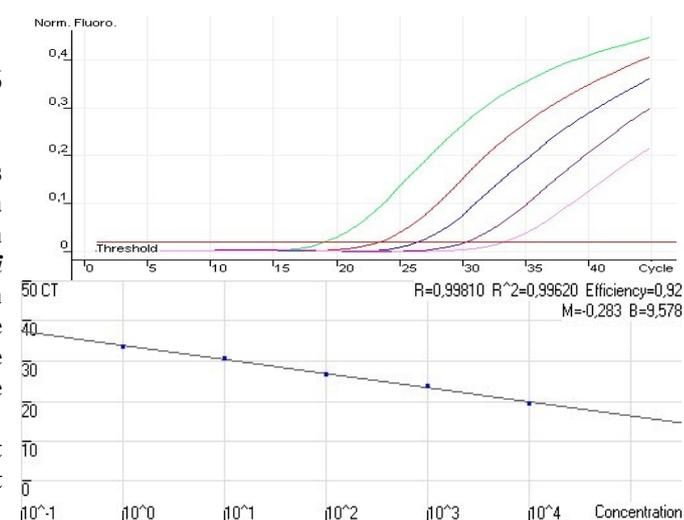
A l'opposé, de *E. bieneusi*, *E. intestinalis* est, quant à lui, cultivable et donc mesurable de manière quantitative, mais vu la faible quantité de selles positives en PCR temps réel, la culture n'a pas été envisagée.

Nous avons cependant réalisé une gamme de dilution de chacune des espèces, sur nos témoins positifs de pur à  $10^{-4}$ .

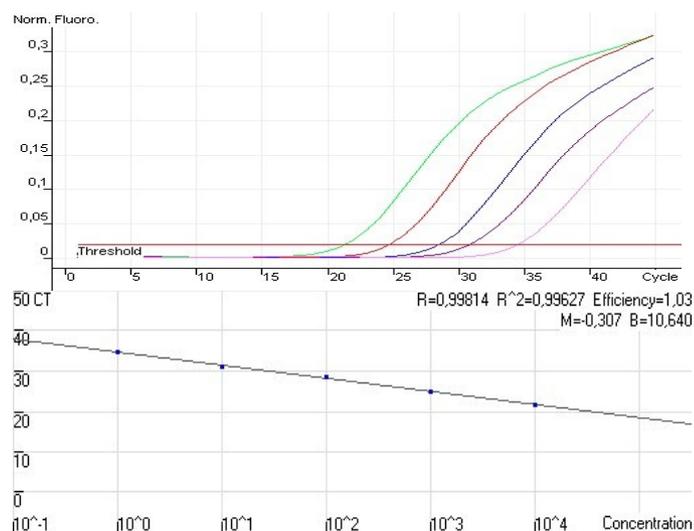
Nous avons alors pu déterminer un coefficient de corrélation  $r$  et le rendement de chaque PCR. Pour valider une droite d'étalonnage,  $r^2$  doit être supérieur à 0,99 et le rendement (R) proche de 1. (Figure 26 et 27)

- PCR temps réel *E. bienersi* :

**Figure 26**  
**Réaction**  
**d'amplification**  
**des différentes**  
**dilutions de la**  
**gamme du témoin**  
**positif *E. bienersi***  
**et courbe étalon**  
**permettant de**  
**calculer le**  
**coefficient de**  
**corrélacion**  
**linéaire ( $r=0,99$ )**  
**et le rendement**  
**( $R=92\%$ )**



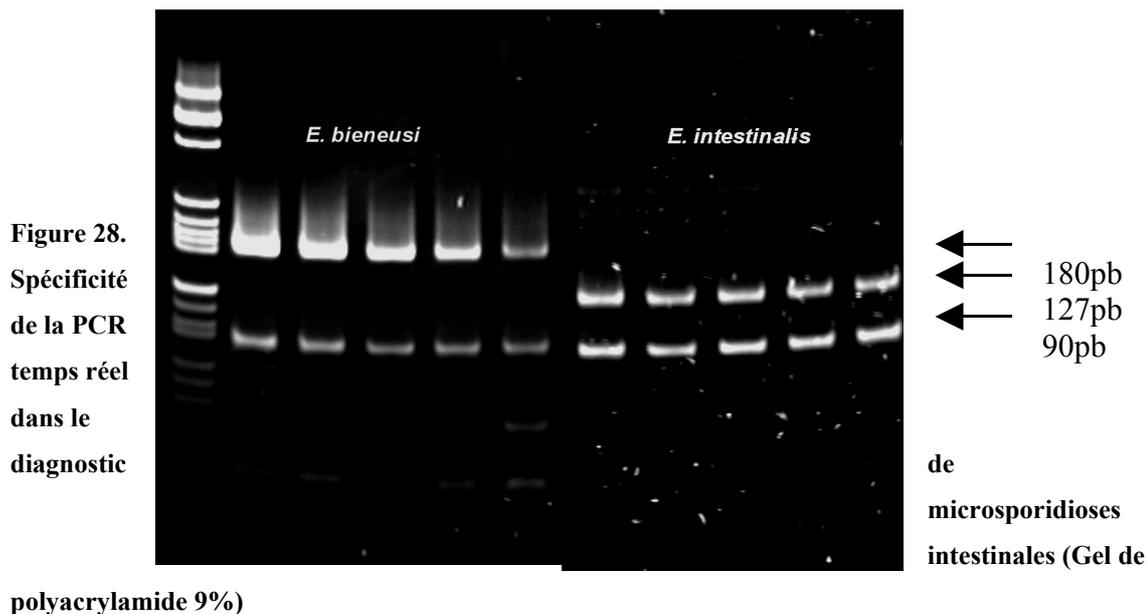
- PCR temps réel *E. intestinalis*:



**Figure 27 Réaction d'amplification des différentes dilutions de la gamme du témoin positif *E. intestinalis* et courbe étalon permettant de calculer le coefficient de corrélacion linéaire ( $r=0,99$ ), le rendement ( $R=103\%$ )**

## I.2.2. Spécificité

La taille des fragments amplifiés a été vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 9% (Annexe 8). Deux fragments de 180 et 127 pb sont respectivement retrouvés pour *E. bieneusi* et *E. intestinalis*. La spécificité de la PCR temps réel est vérifiée par la présence d'une bande unique pour chaque espèce à la taille attendue. (Figure 28)



Le témoin négatif ne présente pas de bande à 127 et 180 pb mais une bande unique de plus petite taille (tout comme les échantillons), entre 80 et 89 pb, correspondant aux fragments d'ADN du contrôle positif interne (IPC) amplifié simultanément au cours de la réaction de PCR.

**A une selle positive, pour une espèce donnée, correspond une bande unique, différente en fonction de l'espèce. Notre PCR en temps réel est spécifique.**

## I.2.3. Répétabilité

La répétabilité ou variabilité intra-essai est évaluée en testant plusieurs répliqués à différentes dilutions de la gamme pour une même expérience dans le même milieu réactionnel (Tableau XII et XIV). Les coefficients de variation sont ensuite calculés à partir des différentes mesures obtenues (Tableau XIII et XV).

$$m \text{ (moyenne)} = (Ct1+Ct2+\dots+Ctn)/n$$

$$S^2 \text{ (variance)} = ((Ct1-m)^2 + (Ct2-m)^2+\dots+ (Ctn-m)^2)/n$$

$$\sigma \text{ (écart-type)} = S = \sqrt{S^2}$$

$$CV \text{ (coefficient de variation)} = \sigma/m$$

### I.2.3.1.PCR *Enterocytozoon bienersi*

	Cycling Threshold (Ct obtenus pour chaque essai de répétabilité)									
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
<b>Témoin positif pur</b>	19.84	19.57	19.74	19.56	19.66	19.47	19.37	19.25	19.98	20.19
<b>Témoin positif 1/5</b>	22.37	22.15	21.86	21.85	21.70	22.01	21.82	24.17	23.74	22.71
<b>Témoin positif 1/10</b>	23.51	23.32	23.44	23.09	23.32	24.09	23.79	23.16	23.07	24.02

**Tableau XII. Essai de répétabilité pour la PCR temps réel *E. bienersi***

Afin de mesurer la disparité de ces échantillons autour de leurs moyennes, nous avons calculé leur variance, écart-type et coefficient de variation.

	Témoin positif pur	Témoin positif (dilution 1/5)	Témoin positif (dilution 1/10)
<i>Moyenne des Ct</i>	19.66	22.4	23.5
<i>Variance</i>	0.073	0.66	0.12
<i>Ecart type</i>	0.27	0.81	0.35
<i>CV (en %)</i>	1.4	3.6	1.5

**Tableau XIII. Répétabilité de la PCR *E. bienersi* : moyennes, variances, écarts types et coefficients de variation**

**Les coefficients de variation obtenus se situent entre 1.4% et 3.6%, ces résultats sont donc satisfaisants (valeur attendue inférieure à 5%).**

### I.2.3.2.PCR *Encephalitozoon intestinalis*

Seulement quatre échantillons de chaque dilution ont été testés pour *E. intestinalis* en raison de la faible quantité de témoin positif disponible pour la réalisation des PCR temps réel de notre étude.

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
<b>Témoin positif Pur</b>	21.84	21.57	21.67	21.82
<b>Témoin positif 1/10</b>	25.08	25.24	25.24	25.15
<b>Témoin positif 1/100</b>	29.84	29.64	29.26	29.03

**Tableau XIV. Essai de répétabilité pour la PCR *E. intestinalis***

Afin de mesurer la disparité de ces échantillons autour de leurs moyennes, nous avons calculé leur variance, écart-type et coefficient de variation.

	Témoin positif pur	Témoin positif (dilution 1/10)	Témoin positif (dilution 1/100)
<i>Moyenne des Ct</i>	21.7	25.18	29.44
<i>Variance</i>	0.013	0.0045	0.05
<i>Ecart type</i>	0.11	0.07	0.22
<i>CV (en %)</i>	0.52	0.26	0.76

**Tableau XV. Répétabilité de la PCR *E. intestinalis* : moyennes, variances, écarts types et coefficients de variation**

**Les valeurs des coefficients de variations sont faibles, comprises entre 0.26% et 0.76%, elles sont donc satisfaisantes.**

#### I.2.4.Reproductibilité

Nous avons évalué la reproductibilité ou variabilité inter-essai sur 4 à 5 tests, réalisé avec le même milieu réactionnel. (Tableau XVI et XVII)

Pour cela nous avons repris les Ct des PCR temps réel réalisées au cours de cette étude, avec le même témoin positif et le même mélange réactionnel (mix), pour chaque espèce.

##### I.2.4.1.*Enterocytozoon bienewisi*

	Cycling Threshold (Ct)					<i>Moyenne des Ct</i>	<i>CV (en %)</i>
Témoin Positif (pur)	19.4	19.9	19.8	20.3 2	NR	19.86	3.30
Témoin positif (dilution1/5)	22.5	22.0	22.2	22.3	22.17	22.23	1.62

		1					
--	--	---	--	--	--	--	--

**Tableau XVI** Essai de reproductibilité pour la PCR *E. bienersi*

I.2.4.2. *Encephalitozoon intestinalis*

	Cycling Threshold					Moyenne des Ct	CV (en %)
Témoin positif (dilution 1/10)	24.8	25.0	25.9	25.9	25.08	25.36	3.97
	6	4					

**Tableau XVII** Essai de répétabilité pour la PCR *E. intestinalis*

Les essais de reproductibilité ont été réalisés sur un petit nombre de tests. Les valeurs des coefficients de variation sont comprises entre 1.62 et 3.97. Ces résultats sont convenables.

**Notre PCR en temps réel est à la fois reproductible et répétable**

## **II. Application de la PCR temps réel dans la recherche des microsporidioses intestinales**

Suite au dépistage des microsporidioses intestinales réalisés sur le terrain, à Hanoi et à Niamey en microscopie optique par des techniques de coloration (UVITEX 2B/UVIBIO et trichrome modifié de Weber) sur des selles de patients, la confirmation des cas positifs ou douteux a été effectué par les techniques de PCR temps réel, spécifique d'*E. bienewisi* et *E. intestinalis*.

Tous les résultats sont regroupés en Annexe 11. Le Tableau XXV regroupe les résultats positifs en PCR temps réel *E. bienewisi*

Au cours des amplifications, nous n'avons rencontré aucun problème de contamination.

La présence d'inhibiteurs de PCR a été observée à 3 reprises.

### **II.1. Vietnam**

#### **II.1.1. Caractéristiques de la population étudiée**

Au total, 213 échantillons de selles ont été récoltés durant la période de l'étude. Les résultats sont regroupés en Annexe 11a.

La moyenne d'âge des patients était de 16,5 ans (de 1 an à 75 ans), le majorité des patients avait entre 0 et 5 ans ou entre 20 et 40 ans (Figure 29). Le sex ratio était environ égal à 1.

Quarante trois patients (20%) ont été indiqués comme séropositifs pour le VIH (soit par les patients eux même, soit par leur provenance de BAVI, centre d'accueil de patients séropositifs). Le reste des patients était soit de statut immunitaire inconnu (60%, dont 45% d'enfants de 1 à 10 ans) ou pour certains atteints de lupus systémique ou SLE (18%). (Figure 30)

L'origine géographique des patients était assez hétérogène, 58% provenait de Hanoï, 29% de sa province. Pour 13% des patients ce renseignement n'est pas connu.

Les principaux hôpitaux représentés étaient Bach Mai (Service de Médecine Interne), situé en plein cœur de Hanoï (33%), et Saint Paul (Hôpital Mère-Enfants, 44%) (Figure 31)

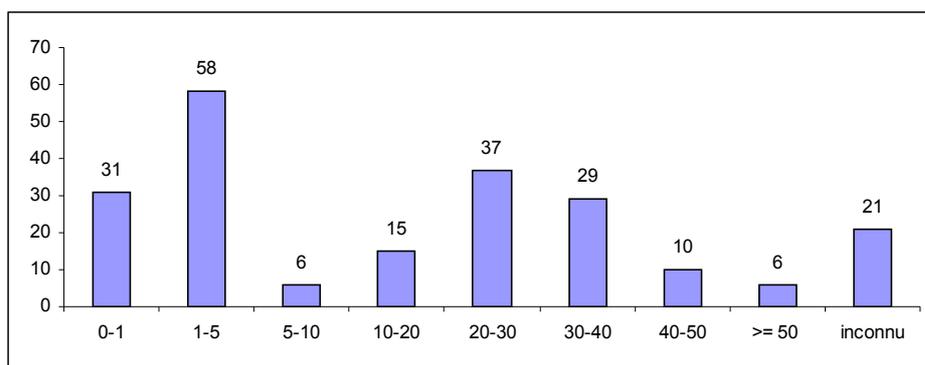


Figure 29. Représentation graphique de la répartition des âges de la population étudiée au Vietnam.

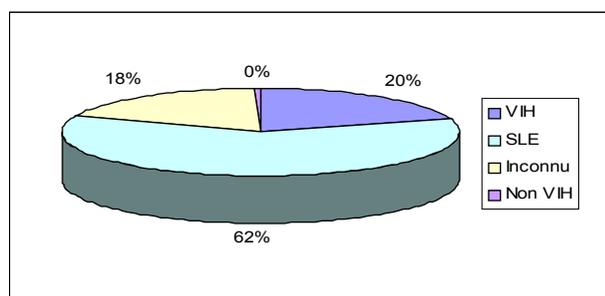


Figure 30 Représentation graphique du statut immunitaire de la population étudiée au Vietnam

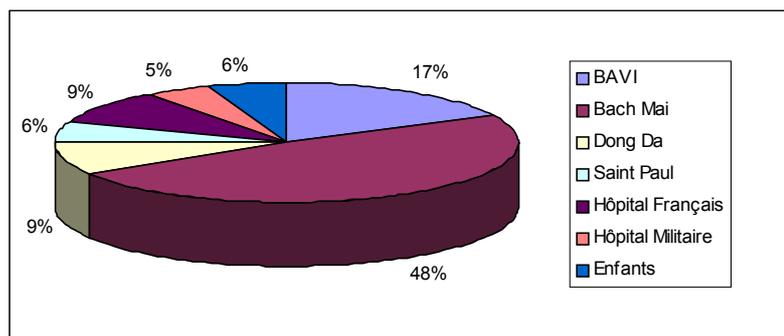


Figure 31 Représentation graphique de la répartition de la population étudiée en fonction des différents hôpitaux

### II.1.2. Caractéristiques des cas positifs en PCR temps réel

Parmi les échantillons récoltés, 66 ont été considérés comme positifs ou douteux pour le dépistage des microsporidies intestinales en microscopie optique, soit une prévalence globale de 31%. Tous ces échantillons ont ensuite été analysés par PCR temps réel. Malheureusement seulement 6 ont pu être confirmés (5 pour *E. bienewisi* et 1 pour *E. intestinalis*).

La prévalence des microsporidies intestinales parmi notre population d'étude était alors de 2,8%. Dans la population étudiée, 43 sujets étaient séropositifs pour le VIH, or 4 étaient porteurs de microsporidies. La prévalence parmi la population VIH a alors été ramenée à 9,3%.

Sur les six cas de microsporidies intestinales, regroupés dans le tableau XVIII, le sex ratio était de 2 et l'âge moyen de 21 ans (de 2 à 34 ans). Quatre patients habitaient en Province et étaient séropositifs pour le VIH. Les deux autres patients habitaient Hanoï, âgés de 3 ans et 2 ans, leurs statuts immunitaires étaient inconnus. Les CD4 que nous avons pu obtenir (sur trois patients adultes) sont assez élevés, avec une moyenne de 258/mm<sup>3</sup>.

	Sexe	Age	Espèce retrouvée	Hôpital	Origine Géographique	Statut immunitaire	CD4/mm <sup>3</sup>
H54	M	34	E. b	Institut Militaire	Province	VIH	75
H86	M	30	E. b	Bach Mai	Province	VIH	500
H114	F	27	E. i	Bavi	Province	VIH	

H166	M	32	E. b	Bach Mai	Province	VIH	198
H173	F	3	E. b	St Paul	Hanoï	Inconnu	
H213	M	2	E. b	St Paul	Hanoï	Inconnu	

**Tableau XVIII. Caractéristiques des patients atteints de microsporidioses intestinales au Vietnam (E. b = *E. bieneusi*, E. i= *E. intestinalis*)**

**Le taux de prévalence des microsporidioses intestinales retrouvé dans une population générale au Vietnam est de 2,8% (6/213).**

## II.2.Niger

### II.2.1.Caractéristiques de la population étudiée au Niger

Au total, 228 échantillons de selles de patients séropositifs pour le VIH ont été récoltés dans les différents centres de prescription d'ARV à Niamey. L'ensemble des résultats a été regroupé en Annexe 10b.

Au cours de cette étude plusieurs données ont été répertoriées, notamment l'âge, le sexe, le nombre de CD<sub>4</sub>, l'aspect des selles, la présence ou non de diarrhées. Certains prélèvements n'ont pas été renseignés pour tous les items.

La moyenne d'âge était de 34 ans (de 1 à 58 ans), le sex ratio égal à 1. La majorité des patients avaient entre 20 et 40 ans (68%). (Tableau XIX)

Le nombre de lymphocyte CD<sub>4</sub> moyen était de 266/mm<sup>3</sup>. La plupart des patients avaient un total de CD<sub>4</sub> supérieur à 100/mm<sup>3</sup> (67%). (Tableau XX)).

Sur 169 prélèvements renseignés sur les traitements, 19 patients (11%) disposaient déjà d'un traitement anti-rétroviral au moment de l'inclusion.

La recherche d'autres parasites opportunistes comme les cryptosporidies a été réalisé par une coloration de Ziehl, 19 patients étaient porteurs, soit 8% de la population (n=228).

La seule donnée clinique dont nous disposions était la présence ou non de diarrhée, chronique ou aiguë. Cette donnée est subjective, en effet elle reste à l'appréciation des patients, aucun critère de durée ou de fréquence n'avait été défini. Sur 170 échantillons

renseignés, 89 patients ne présentaient pas de diarrhée (52%), 20 une diarrhée aiguë (12%), et 61 une diarrhée chronique (36%). (Figure 32)

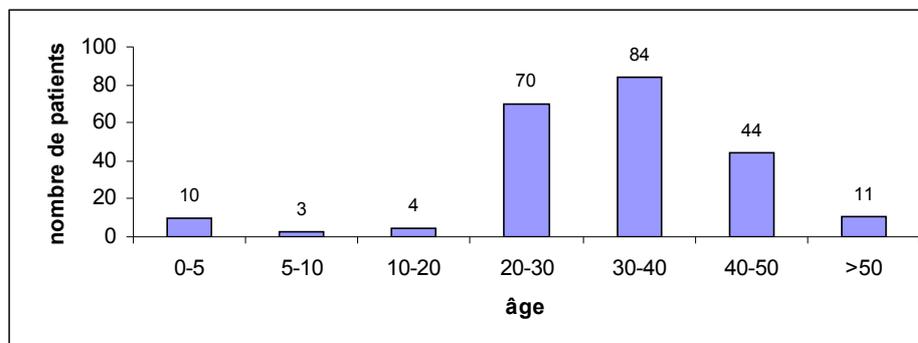
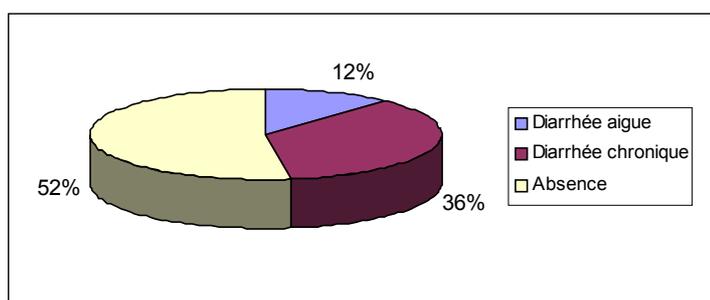


Tableau XIX Représentation graphique de la répartition des âges de la population étudiée (N=226)

<b>Nombre de numération des CD4</b>	<b>225</b>
Moyenne (/mm <sup>3</sup> )	266
Minimum (/mm <sup>3</sup> )	1
Maximum (/mm <sup>3</sup> )	2000
0-50 (%)	50 (22)
50-100 (%)	24 (11)
100-200 (%)	54 (24)
>200 (%)	97 (43)

Tableau XX : Caractéristiques du taux de CD<sub>4</sub> dans la population étudiée (N=225)



**Figure 32 Répartition graphique de la présence ou non de diarrhées dans la population étudiée (N=170)**

### II.2.2. Caractéristiques des cas positifs en PCR temps réel

▪ Sur la totalité des ces échantillons, 62 ont été considérés comme douteux ou positifs en microscopie optique. La prévalence globale était alors de 27% uniquement par microscopie optique. La technique de PCR temps réel, nous a permis de confirmer 24 cas de microsporidioses intestinales à *E. bienewisi*. Aucun cas de microsporidiose à *E. intestinalis* n'a été retrouvé. (Tableau XXI)

La prévalence de *E. bienewisi* dans notre population a été estimée à 10,5%.

	Microscopie optique (n=228)* positif ou douteux en coloration
<i>Enterocytozoon bienewisi</i> PCR positive	24
<i>Enterocytozoon bienewisi</i> PCR négative	36

**Tableau XXI Répartition des cas de microsporidioses intestinales comparées à la microscopie optique. (\*un échantillon était en quantité insuffisante et un était absent pour la biologie moléculaire, d'où N=15)**

Le nombre d'hommes porteurs de microsporidioses intestinales était de 62,5% (15/24) et de 37,5% des femmes (9/24). L'âge moyen était de 34 ans (de 7 à 50 ans).

#### -Taux de CD4

Le taux de CD4<100/mm<sup>3</sup> a été considéré comme un facteur de risque de microsporidioses intestinales (p<0,001) (Asmuth, DeGirolami *et al.* 1994; Navin, Weber *et al.* 1999). Nous avons alors comparé, parmi les échantillons positifs en PCR temps réel, les taux de CD4 associés. La majorité des patients était très

immunodéprimé. Ils avaient un nombre de CD4 inférieur à 100, voire même 50/mm<sup>3</sup> (Tableau XXII).

	CD4<50/mm <sup>3</sup>	50<CD4<100/mm <sup>3</sup>	100<CD4<200/mm <sup>3</sup>	CD4>200/mm <sup>3</sup>
PCR positive <i>E. bienewisi</i> (%)	13 (59%)	3 (14%)	2 (9%)	4 (18%)

**Tableau XXII Répartition du nombre de PCR positives à *E. bienewisi* en fonction du taux de CD4**

**-Prévalence de la symptomatologie diarrhéique**

Parmi les échantillons positifs, la présence ou non de diarrhées n'était connu que pour 20 des 24 patients. Parmi ces derniers, 10 (50%) avaient une diarrhée chronique, 3 (15%) une diarrhée aiguë et 7 (35%) n'avait pas de symptomatologie diarrhéique.

**-Traitements**

Parmi les patients bénéficiant d'une multithérapie au moment de l'inclusion (19 patients), trois étaient porteurs de microsporidies. Deux d'entre eux disposaient d'un traitement depuis seulement 1 mois et leurs taux de CD<sub>4</sub> étaient très bas (respectivement 21 et 41/mm<sup>3</sup>). Le troisième suivait un traitement depuis 9 mois et présentait un taux de CD<sub>4</sub> égal à 171/mm<sup>3</sup>.

**-Co-infections**

Une coloration de Ziehl pour les recherches des oocystes de cryptosporidies a été réalisée en complément de la coloration de van Gool. Parmi les échantillons positifs en PCR temps réel, 7 patients étaient également positifs pour la recherche de cryptosporidies, soit 29%. Leur moyenne de CD<sub>4</sub> était de 48/mm<sup>3</sup> (de 1 à 171). Tous présentaient une diarrhée. Un seul patient était sous traitement antirétroviral.

D'après la littérature, les principaux facteurs de risque de microsporidies intestinales sont l'immunodépression (VIH, transplantation...), la présence de diarrhées chroniques, le taux de CD<sub>4</sub> <50/mm<sup>3</sup>, Nous avons regroupé dans un tableau les facteurs de risque possibles, dans notre population.

Facteurs de risque	PCR positive <i>Enterocytozoon bienewisi</i>	Prévalence dans notre population	P
--------------------	--	----------------------------------	---

	n=24		
CD4<50/mm3 (n=225)	13	6%	<0,001
CD4<100/mm3 (n=225)	16	7%	<0,001
Diarrhées (n=170)	13	7,5%	0,1
Diarrhées chroniques (n=170)	10	6%	NS
Sexe (Homme) (n=228)	15	6,5%	NS
Age (20-40 ans) (n=228)	17	7,5%	NS
Traitement ARV (n=170)	3	2%	NS

**Tableau XXIII Facteurs de risque pouvant être associés à la présence de microsporidioses intestinales (Test du Chi2 à 5%) ns ::non significatif**

**Le taux de prévalence des microsporidioses intestinales retrouvé dans une population VIH au Niger est de 10,5%. Le principal facteur de risque retrouvé est le taux de CD4<100/mm<sup>3</sup>.**

### II.3.France

Au total, de octobre 2004 à mars 2006, 182 demandes pour recherche de microsporidies ont été effectuées au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes. Parmi ces échantillons, 10 ont été considérés comme positifs ou douteux en colorations. Quatre de ces échantillons provenaient de Centre Hospitaliers extérieurs (3 du CHU de Nice et 1 du Centre Hospitalier de Vannes). Les six échantillons de Nantes ont été retrouvés négatifs en PCR temps réel. Parmi les trois échantillons du CHU de Nice, deux étaient positifs à *E. bienewisi* (THO, LAR) et 1 à *E. intestinalis* (VAN) (il s'agissait d'une urine). Le patient originaire de Vannes (QUE) était porteur de microsporidiose intestinale à *E. bienewisi*.

On peut alors estimé une prévalence en France des microsporidiose intestinales à environ 2%

Le patient THO, était un enfant de 3 ans, arrivé récemment d'Haïti. Il présentait une diarrhée et de la fièvre. Il était aussi porteur de *Giardia*. Il était séronégatif au VIH.

VAN, patient VIH, avait un taux de CD<sub>4</sub> très faible (2/mm<sup>3</sup>). Une orchite-épididymite avec des microsporidies avait été diagnostiquée en anatomo-pathologie. Nous avons reçu un prélèvement d'urine pour la réalisation de la PCR temps réel spécifique *E. intestinalis*.

QUE, patient VIH, suivi dans la région Bretagne, avait un taux de CD<sub>4</sub> égal à 91/mm<sup>3</sup>, Sa charge virale était indétectable. Ce patient était traité par AZT-3TC-EFV, plus du Macrolin<sup>®</sup>. Il n'a jamais quitté la métropole.

LAR, patient transplanté, immunodéprimé par les traitements immunosuppresseurs.

Origine	Nom	âge	sexe	statut immunitaire	Taux de CD4 (mm <sup>3</sup> )
Nice	THO. (E. b)	3	M	Non VIH-Haïti	
Nice	LAR. (E. b)			Transplanté	
Nice	VAN (E. i) (urine)	44	M	VIH	2
Vannes	QUE. (E. b)	39	M	VIH	91

**Tableau XXIV Caractéristiques des patients atteints de microsporidioses intestinales en France**

**La prévalence retrouvée en France sur notre population à majorité séropositive au VIH est de 2%**

Résultats

	Sexe	Age	Hôpital	Aspect	Diarrhée	Autres	Statut Itr	CD4	IF	Weber	Ziehl	PCR E. b	PCR E. i	Séquençage
<b>H54</b>	H	34	I milit	chamoix			HIV	75	pos	pos	nr	pos	neg	Génotype "E"
<b>H86</b>	H	30	BM1				HIV	500	pos	pos	nr	pos	neg	Génotype D
<b>H166</b>	M	32	BM1				HIV	nr	pos	pos	nr	pos	neg	Génotype E
<b>H173</b>	F	3	st paul				enf		pos	pos	nr	pos	neg	Génotype D
<b>H213</b>	M	2	st paul				enf		pos	pos	nr	pos	neg	Génotype E
<b>N2</b>	M	34			chronique		HIV	271	pos	neg	neg	pos	neg	Génotype A
<b>N5</b>	M	43			chronique		HIV	59	pos	pos	pos	pos	neg	Génotype A
<b>N6</b>	F	36			chronique		HIV	21	pos	neg	neg	pos	neg	Génotype K
<b>N8</b>	M	28			chronique		HIV	23	pos	pos	pos	pos	neg	Génotype E ou K
<b>N9</b>	M	35			chronique		HIV	23	pos	neg	neg	pos	neg	Génotype A
<b>N11</b>	M	42			chronique		HIV	26	pos	neg	pos	pos	neg	Génotype D
<b>N15</b>	M	39			non		HIV	66	pos	neg	neg	pos	neg	Génotype A
<b>N30</b>	M	34			chronique		HIV	22	pos	pos	pos	pos	neg	Génotype A
<b>N43</b>	F	45			non		HIV	10	pos	neg	neg	pos	neg	Génotype B
<b>N55</b>	M	38			chronique	ttt 9mois	HIV	171	pos	pos	pos	pos	neg	pas de résultat
<b>N75</b>	F	28			chronique		HIV	19	pos		neg	pos	neg	Génotype A
<b>N76</b>	F	36			aigue	ttt 1mois	HIV	21	pos		neg	pos	neg	Génotype A
<b>N78</b>	M	41			chronique		HIV	304	pos		neg	pos	neg	pas de résultat
<b>N98</b>	F	22			non		HIV	630	pos		neg	pos	neg	Génotype" B"
<b>N102</b>	M	50			non		HIV	129	pos		neg	pos	neg	pas de résultat
<b>N115</b>	M	43			aigue		HIV	31	pos		neg	pos	neg	Génotype A
<b>N125</b>	F	38			non		HIV	476	pos		neg	pos	neg	pas de résultat
<b>N126</b>	M	40			non	ttt 1mois	HIV	41	pos		neg	pos	neg	pas de résultat
<b>N130</b>	M	34			aigue		HIV	125	pos		neg	pos	neg	pas de résultat
<b>N155</b>	M	38			non		HIV	40	pos		neg	pos	neg	Génotype B
<b>N'8</b>	M	30		molle			HIV	36	pos	pos	neg	pos	neg	Génotype A
<b>N'13</b>	F	29		molle			HIV	190	pos	pos	neg	pos	neg	pas de résultat
<b>N'24</b>	F	30		molle			HIV	37	pos	pos	pos	pos	neg	Génotype A
<b>N'48</b>	F	7		molle			HIV	1	pos	pos	pos	pos	neg	Génotype "B"
<b>THO</b>	M	3	Nice		oui		non HIV		pos	pos	nr	pos	neg	Génotype "B"
<b>LAR</b>	M		Nice		oui		Transplanté		pos	pos	nr	pos	neg	nouveau génotype ?
<b>QUE</b>	M		Vannes		oui	oui	HIV	91	pos	pos	nr	pos	neg	Génotype « K »

**Tableau XXV Récapitulatif des résultats positifs en PCR temps réel *E. bienersi***

### III. Etude des génotypes

#### III.1. Génotypes décrits chez l'homme

Le développement de la biologie moléculaire et en particulier, l'analyse de la région non codante du génome comme la séquence ITS du gène codant l'ARN ribosomique (ADNr ITS), qui possède des sites de polymorphisme, permet d'étudier les variations génétiques des espèces de microsporidies humaines. Actuellement plus de 50 génotypes de *E. bienewsi* ont été décrits et référencés dans GenBank. Des études montrent la présence de certains génotypes exclusivement chez l'homme (comme les génotypes A ou B), d'autres chez l'homme et certains animaux (comme les génotypes D, E ou K), alors que d'autres n'ont été retrouvés que chez des animaux (comme les génotypes P ou G) (Annexe 12).

Certains de ces génotypes sont identiques au niveau de la zone de polymorphisme ITS, ils ont donc été rassemblés (exemple : IV=K=BEB5=Peru2).

D'après une étude récente (Mathis, Weber *et al.* 2005) seize génotypes ont été décrits chez l'homme : 5 dans plusieurs études (A,B/I, C/II, D et IV), et 11 dans des études individuelles (Q, III, V, Peru3, Peru4, Peru5, Peru6, Peru7, Peru8, Peru10 et Peru11).

Les séquences complètes des régions ITS des génotypes connus pour *E. bienewsi* sont en Annexe 12 et les alignements des génotypes connus chez l'homme, en Annexe 13.

#### III.2. Génotypes retrouvés au cours de l'étude

Le produit d'amplification de la PCR réalisée avec les primers MSP3/MSP4B a été directement amplifié après purification. Les séquences de 243 paires de base (région ITS) ont été comparées avec les séquences répertoriées dans la base de données GenBank (Blast) et BiBi (<http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/query.php>). Toutes les séquences ont une très grande identité avec les séquences d'*Enterocytozoon bienewsi*.

Sur 32 échantillons positifs à *E. bienewsi* retrouvés à la fois au Vietnam, au Niger et en France, 5 n'ont pas pu être séquencés, tous au Niger. Les séquences ont été alignées sur *Multalin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

##### III.2.1. Génotypes retrouvés au Vietnam

Cinq échantillons ont été séquencés. Nous n'avons pas retrouvé de grande diversité entre les différents génotypes. Les alignements ont été regroupés en Annexe 14.

- Les deux séquences (H86 et H173) sont identiques au génotypes D, qui a déjà été retrouvé, plusieurs fois, chez l'homme au Pérou, en Allemagne, en Grande Bretagne, au Gabon (Breton, Kombila *et al.* 2004), mais aussi chez le porc, le macaque, le renard, le castor et le rat musqué (Sadler, Peake *et al.* 2002) ; (Rinder, Katzwinkel-Wladarsch *et al.* 1998; Chalifoux, Carville *et al.* 2000; Buckholt, Lee *et al.* 2002; Sulaiman, Bern *et al.* 2003).
- Deux autres séquences (H166 et H213) sont identiques au génotype E. Il a été retrouvé chez l'homme dans une étude, sous le nom de génotype Peru4 (Sulaiman, Bern *et al.* 2003). Il est identique aux génotypes EbpC, WL13, retrouvé chez le porc, le castor et le rat musqué (Deplazes, Mathis *et al.* 1996; Breitenmoser, Mathis *et al.* 1999). La dernière séquence (H54) diffère du génotype E par une seule base.

**Les deux principaux génotypes retrouvés au Vietnam sont les génotypes D (PigEBITS9/WL8) et E (EbpC/WL13/Peru4), retrouvés dans plusieurs études chez l'homme mais aussi chez le singe, le porc, le renard, le castor et le rat musqué.**

### III.2.2. Génotypes retrouvés au Niger

- Sur les 17 échantillons séquencés, 10 (60%) correspondent au génotype A. Le génotype A est retrouvé dans plusieurs études chez l'homme, et en particulier chez des patients VIH, en Suisse, en Allemagne, au Pérou, en Thaïlande (enfants VIH et non VIH) (Rinder, Katzwinkel-Wladarsch *et al.* 1997; Breitenmoser, Mathis *et al.* 1999; Sulaiman, Bern *et al.* 2003; Leelayoova, Subrungruang *et al.* 2005). Aucun hôte vertébré animal n'est connu pour ce génotype.
- La séquence N11 est identique à la séquence ITS du génotype D/PigEBITS9/WL8. Ce génotype a été retrouvé chez l'homme, le porc, le macaque, le raton laveur, le castor et le rat musqué. Plusieurs études montrant sa présence chez l'homme, en particulier des patients VIH en Suisse, Allemagne, Grande Bretagne, Gabon, Pérou (cf Génotypes au Vietnam).

▪ La séquence N6 est identique à la séquence ITS du génotype K/IV/BEB5/Peru2. Ce génotype a été retrouvé à plusieurs reprises chez l'homme, en particulier chez des patients VIH et récemment au Cameroun, Gabon et Ouganda, chez des enfants aux statuts immunitaires inconnus (Liguory, David *et al.* 1998; Sadler, Peake *et al.* 2002; Tumwine, Kekitiinwa *et al.* 2002; Sulaiman, Bern *et al.* 2003; Breton, Kombila *et al.* 2004; Sarfati, Bourgeois *et al.* 2006).

▪ Les autres génotypes retrouvés ne sont pas identiques à 100% à des génotypes retrouvés dans la littérature :

-N43, N155 et N'48. Ces séquences sont identiques entre elles et diffèrent d'une base par rapport au génotype B. Ce génotype a déjà été retrouvé dans plusieurs études mais uniquement chez l'homme, comme le génotype A. Des études ont mis en évidence sa présence en France, en Suisse, en Allemagne, en Grande Bretagne (Rinder, Katzwinkel-Wladarsch *et al.* 1997; Liguory, David *et al.* 1998). Il est identique au génotype Type I. Ces trois séquences peuvent être soit du génotype B, mais avec une base de différence, soit un autre génotype, non publié proche du génotype B

-N8 et N98. Ces deux séquences ne sont pas identiques à 100% avec des séquences connues. Elles sont cependant identiques entre-elles. Les séquences les plus proches sont celles des génotypes IV/K/BEB5/Peru2 ou E/EbpC/WL13. Chacune ne diffère que d'une seule base (Annexe 15).

**Les génotypes retrouvés au Niger sont principalement le génotype A (60%) et un génotype proche du B. Les autres génotypes retrouvés sont D, K.**

### III.2.3. Génotypes retrouvés en France

Les trois échantillons positifs en PCR temps réel *E. bienewisi* ont été séquencés (Annexe 16) :

-QUE.

Cette séquence est presque identique à la séquence du génotype au génotype IV/K/BEB5, mais deux bases diffèrent.

-THO.

Cette séquence est presque identique au génotype B, une seule base diffère.

-LAR.

Cette séquence ne présente pas d'homologie avec les séquences connues, elle possède deux bases en moins dans la région ITS et présente une trentaine de base de différences avec les autres génotypes de cette étude. (Annexe 17)

### III.2.4.Comparaison des génotypes

Les génotypes retrouvés au Vietnam, au Niger et en France ne sont pas identiques. Au Niger, une prédominance du génotype A a pu être mise en évidence (60%), génotypes exclusivement humain, retrouvé dans différentes zones géographiques, aussi bien des pays développés, qu'en voie de développement (Figure 33).

Le génotype K, retrouvé uniquement au Niger, n'a pas été mis en évidence au Vietnam. Au Vietnam, les deux principaux génotypes retrouvés sont D et E. Le génotype D, présent à la fois au Vietnam et au Niger n'est pas exclusivement humain, toute fois il a déjà été retrouvé chez des patients VIH. .

Plusieurs séquences ne présentent pas une homologie de 100% avec les génotypes connus, cependant, à la fois en France et au Niger, 4 séquences identiques entre elles sont très proches du génotype B.

La séquence de THO, retrouvée en France est identique aux séquences retrouvées au Niger, avec la même base qui les différencie du génotype B/I.

Une séquence se détache des génotypes connus : LAR.

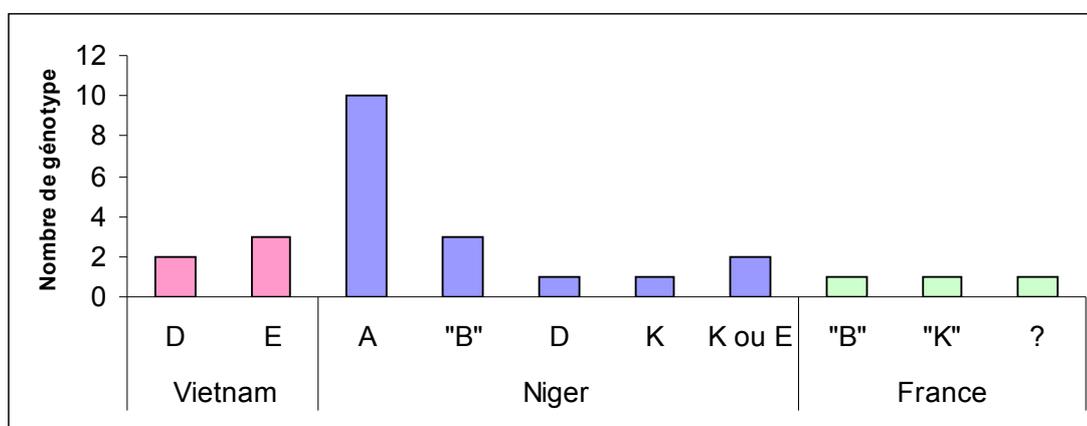


Figure 33 Représentation des différents génotypes retrouvés au Vietnam, Niger et France

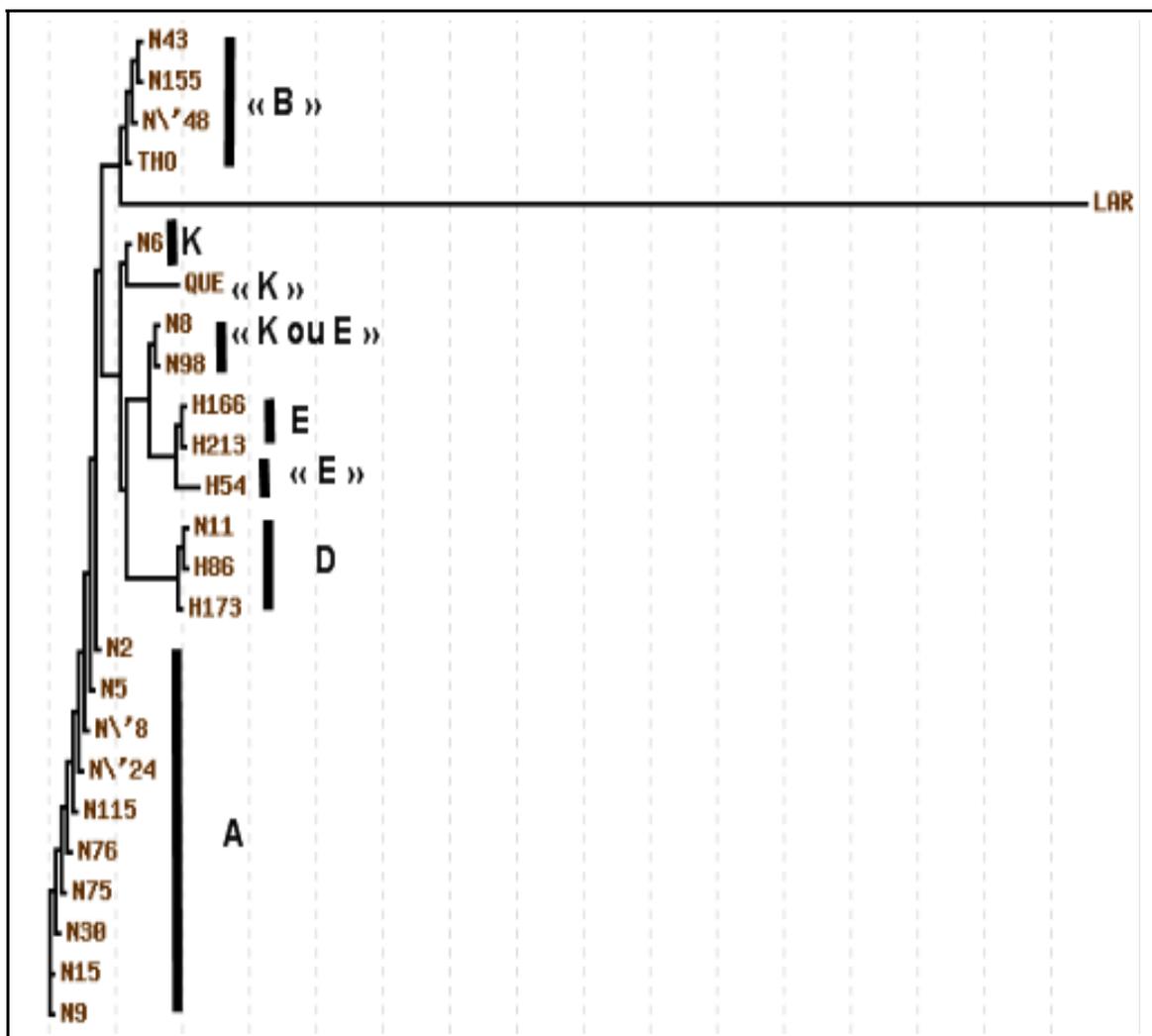


Figure 34 Arbre phylogénique des différentes séquences étudiées, à la fois au Vietnam, Niger et France ( <http://www.genebee.msu.su/index.html>)

*Partie IV*

*Discussion*

Au Vietnam, aucune étude concernant les microsporidies n'avait été réalisé auparavant et seulement quelques études en Thaïlande, ou en Inde donnaient une idée de la prévalence des microsporidioses intestinales en Asie du Sud Est. Sur le continent africain, les microsporidies avaient déjà été étudiées, notamment en Ouganda, au Mali, Zimbabwe, Cameroun, Tanzanie, Guinée, Ethiopie, Gabon ou bien encore au Niger (Annexe 17).

**La prévalence des microsporidioses intestinales au Niger** parmi les patients séropositifs pour le VIH, inclus dans notre étude était de **10,5%** (24/228). Ce chiffre est plus faible que celui rapporté par d'autres auteurs qui estimaient, en Afrique, la prévalence des microsporidioses intestinales entre 13 et 30%, dans une population de patients VIH (van Gool, Luderhoff *et al.* 1995; Carville, Mansfield *et al.* 1997; Maiga, Doumbo *et al.* 1997) (Annexe 17).

Toutefois la majorité des études de prévalence ont le plus souvent été réalisées sur des cohortes de patients souffrant de **diarrhées chroniques** et inexplicées. En 1992, Weber rapportait une prévalence de 29% sur un groupe de 21 patients souffrant de diarrhées chroniques. Cependant cette prévalence chute à 4,5% si l'ensemble des patients examinés est considéré (Weber, Bryan *et al.* 1992; Bretagne, Foulet *et al.* 1993). Dans la littérature les microsporidioses intestinales sont associés à une symptomatologie diarrhéique. Dans notre étude au Niger, la présence de diarrhées chroniques ou aiguës n'a pas été retrouvée comme facteur de risque significatif d'infections intestinales à microsporidies ( $p=0,1$ ). Aussi, il a été rapporté par plusieurs auteurs que les microsporidioses intestinales ne sont pas systématiquement responsable d'une symptomatologie diarrhéique et que cette association reste mal établie (Rabeneck, Gyorkey *et al.* 1993; Tumwine, Kekitiinwa *et al.* 2002).

**La valeur du taux de CD<sub>4</sub>** doit également être pris en compte pour les études de prévalence. En effet, les microsporidioses étant des pathogènes dits « opportunistes », ils constituent ainsi une complication tardive du SIDA. Il en résulte que les patients présentant un taux de CD<sub>4</sub><100/mm<sup>3</sup>, seront donc plus fréquemment porteurs de microsporidies au niveau intestinale que le reste de la population. Dans notre étude, le taux moyen de CD<sub>4</sub> sur la population étudiée était de 266/mm<sup>3</sup>. Néanmoins, nous avons observé que chez les patients dépistés positifs pour la recherche de microsporidies, ce

taux était abaissé à 114/mm<sup>3</sup> (1-630/mm<sup>3</sup>) et qu'un taux de CD4 inférieur à 100/mm<sup>3</sup> était considéré comme le principal facteur de risque de microsporidiose intestinale ( $p < 0,001$ ). Nos résultats sont proches de ceux habituellement retrouvés dans la littérature (inférieur à 100/mm<sup>3</sup>) (Didier, Didier et al. 2000).

Dans les études de Carville, Maiga et van Gool, **la microscopie optique** était la seule méthode utilisée. L'examen microscopique à la recherche de spores de microscopie constitue un challenge difficile et cela doit être pris en compte pour l'interprétation des résultats fournis par une étude de prévalence. Tout d'abord, la petite taille des spores rend la lecture des lames difficile et nécessite un œil exercé. Il faut à ce titre noter l'apport non négligeable des techniques de coloration utilisant des composés fluorescents qui facilitent grandement la lecture par rapport aux méthodes de colorations traditionnelles (Weber, Gram). De plus les pauci infestations mais également les caractéristiques propres d'adhérence responsable d'amas de spores que possèdent ces organismes sont en partie responsable de la médiocre reproductibilité de cet examen (Bretagne, Foulet *et al.* 1993). Enfin, un autre inconvénient de la microscopie est le manque de spécificité de ces techniques. En effet, la mise en évidence des microsporidies au sein d'une flore complexe (bactéries, champignons) telles que peuvent le constituer les selles peut être rendu difficile (Endeshaw, Kebede *et al.* 2005). La prévalence peut donc être mésestimée si elle est réalisée par un lecteur peu exercé. Ce sont d'ailleurs les prévalences que l'on obtient dans notre étude, à la fois au Niger et au Vietnam, si on ne considère que le dépistage par microscopie optique (31% au Vietnam et 27% au Niger contre respectivement 2,8% et 10,5% après biologie moléculaire). On a aussi pu observer dans notre étude que les échantillons considérés comme douteux ou positifs s'avéraient plus souvent positifs en PCR temps réel lorsque les lames étaient examinées par plusieurs lecteurs. En effet, certains échantillons du Niger ont bénéficié d'une lecture en double aveugle. Nous avons pu observé que le nombre d'échantillons positifs en PCR par rapport au nombre d'échantillons positifs en coloration était plus élevé comparé aux résultats d'un lecteur seul et isolé, par exemple au Vietnam.

Des études récentes utilisant l'outil moléculaire comme méthode diagnostic montrent des taux de prévalence assez élevés. Ainsi, au Mali, la prévalence atteint 13% et 17% et 33% en Ouganda (Alfa Cisse, Ouattara *et al.* 2002; Tumwine, Kekitiinwa *et al.* 2002;

Tumwine, Kekitiinwa *et al.* 2005). Cette prévalence élevée, peut être attribuée à une forte prévalence des microsporidies dans ces régions ou bien à un recrutement de patients ciblant des patients à risque (diarrhées chroniques, malnutrition).

En Afrique, peu d'études sont disponibles sur la prévalence d'*E. intestinalis* sur une population de patients VIH. Dans une étude au Mali (Alfa Cisse, Ouattara *et al.* 2002) aucun cas de microsporidiose à *E. intestinalis* n'a été rapporté. En Zambie, la prévalence de ce parasite était évaluée à 3% sur un groupe de 75 patients présentant une diarrhée chronique (Kelly, McPhail *et al.* 1994). Dans notre étude, aucun cas de microsporidiose intestinale à *E. intestinalis* n'a été retrouvé au Niger. Ceci en accord avec les données de la littérature, la prévalence de *E. intestinalis* reste faible comparé à celle de *E. bienewisi* : 7,3% sur des patients VIH aux Etats-Unis, 2% en Allemagne. La prévalence des microsporidies intestinales au Niger est quasiment identique à celle que l'on retrouvait en France avant l'arrivée de la multithérapie et *E. bienewisi* constitue le pathogène le plus fréquent retrouvé dans les microsporidies intestinales.

**Au Vietnam, la prévalence des microsporidies** que nous rapportons par la présente étude a été évaluée à **2,8%** sur la population générale, quelque soit le statut immunitaire des patients et indépendamment de la symptomatologie diarrhéique. Dans la population séropositive pour le VIH étudiée comportant 43, 4 étaient porteurs de microsporidies. La prévalence parmi la population VIH était alors ramenée à 9,3%. On approche alors la prévalence retrouvée au Niger.

Un cas de microsporidiose intestinale à *E. intestinalis* a été mis en évidence au décours de ce travail. Il s'agit du premier cas décrit au Vietnam.

Dans notre étude, les méthodes de colorations (immunofluorescence de van Gool et trichrome modifié de Weber) étaient considérées comme des techniques de dépistage. En effet les techniques de biologie moléculaire n'ont été réalisées qu'en confirmation donc uniquement sur les échantillons de selles positives ou douteuses en coloration, à la fois pour des questions de coûts (environ 2 à 3 euros pour un seul échantillon), de transports (difficultés d'acheminer tous les échantillons de selles à la fois du Niger et du Vietnam jusqu'en France), ou bien pour des raisons techniques (nous disposions d'une très petite quantité de témoin positif à *E. intestinalis*). Nous n'avons donc pas pu effectuer la comparaison entre les techniques de coloration et la biologie moléculaire.

La biologie moléculaire constitue cependant un outil indispensable pour le diagnostic des microsporidioses intestinales. C'est une technique rapide, spécifique, sensible et automatisable. Elle permet d'éliminer les faux positifs du dépistage par microscopie optique mais permet surtout un diagnostic d'espèce, important pour la prise en charge du patient.

**Le traitement des microsporidioses** étant spécifique de chaque espèce, l'infection doit être clairement identifiée afin de déterminer la molécule la plus appropriée. Les microsporidioses intestinales constituent un problème thérapeutique. En effet, La molécule d'albendazole, active sur l'espèce *E. intestinalis*, reste inactive sur *E. bieneusi*, espèce la plus fréquente, et la cytotoxicité de la fumagilline, efficace sur *E. bieneusi*, constitue un obstacle à son utilisation. Les microsporidioses ne constituent pas un problème de santé publique, peu de molécules sont en cours d'expérimentation. De plus, l'impossibilité de cultiver *E. bieneusi* rend impossible l'étude in vitro de ce micro-organisme.

En résumé, la multithérapie antirétrovirale constitue le meilleur traitement des microsporidioses intestinales (Conteas, Berlin *et al.* 1998; Liguory, David *et al.* 1998) car en restaurant les défenses immunitaires on parvient à diminuer l'infestation. Dans notre étude nigérienne, parmi les trois patients porteur de microsporidies et bénéficiant d'un traitement antirétroviral, un seul était traité depuis plusieurs mois (taux de CD4 de  $171/\text{mm}^3$ ), alors que les deux autres patients l'avaient débuté seulement un mois auparavant et leurs taux de CD4 étaient encore bas (respectivement 21 et  $41/\text{mm}^3$ ). Les autres patients sous traitement antirétroviral et non atteints de microsporidiose avaient une moyenne de CD4 égale à  $86/\text{mm}^3$ . Ce chiffre peu élevé pourrait s'expliquer par un taux de CD4 très bas à la mise sous traitement, ou une mauvaise observance du traitement.

En Afrique **l'accès au antirétroviraux** est loin d'être généralisé. Seule une petite partie de la population y ayant accès. De même au Vietnam, l'accès au soin, et le dépistage des patients séropositifs reste très difficile, de par le coût mais aussi les conséquences sociales engendrées par ce diagnostic (rejet par la famille, exclusion de la société).

Peu d'études ont rapporté **une co-infection *Cryptosporidium*/microsporidies**. (Chokephaibulkit, Wanachiwanawin *et al.* 2001; Tumwine, Kekitiinwa *et al.* 2005). Il a

été montré que seule l'infection à VIH était indépendamment associée à la co-infection. Les taux de CD4 associés sont forcément très faible et la présence d'une diarrhée persistante est quasi-systématique dans notre étude. Sept patients de notre étude se sont avérés co-infectés par *E. bienewisi*/*Cryptosporidium spp.* (3%), et d'une manière générale, 29% des sujets atteints de microsporidiose intestinale étaient également porteur d'oocystes de cryptosporidies. Quatre patients présentaient une diarrhée chronique et la moyenne des CD4 était égale à 58/mm<sup>3</sup> (52, 92, 26 et 171/mm<sup>3</sup>). Une étude en Ouganda montrait une prévalence plus élevée de cette co-infection égale à 28% (Tumwine, Kekitiinwa et al. 2005), l'étude concernait des patients VIH atteints de diarrhées chroniques.

Aucune étude n'avait comparé la prévalence et **l'épidémiologie des microsporidiose dans différentes zones géographiques**. Concernant les pays que nous avons étudié, aucune donnée épidémiologique concernant les microsporidioses n'était disponible au Vietnam alors qu'une seule étude (Bretagne, Foulet et al. 1993) avait été conduite au Niger.

**L'étude des géotypes** dans deux zones géographiques, Niger et Vietnam nous a paru intéressante. En effet, tout deux sont des pays en voie de développement, au niveau socio-économique modeste, fortement touchés par l'épidémie du SIDA. D'une manière générale malgré les coutumes et modes de vie différents, ces deux populations présentent un point commun, celui d'avoir un contact étroit avec les animaux notamment chiens, chats, porcs, élevages.

L'analyse de la région polymorphe ITS (Internal Transcribe Spacer) de l'ADN ribosomal de *E. bienewisi* a permis le typage des différentes souches isolées et sa classification en géotypes.

**Les géotypes retrouvés dans l'étude que nous avons mené au Niger** montrent une prédominance du géotype A (60%), géotype strictement humain qui a été décrit dans plusieurs études incluant des patients séropositifs au VIH, mais aussi des enfants qu'ils soient VIH ou non. En Thaïlande, une étude menée dans un orphelinat (Leelayoova, Subrungruang et al. 2005) a montré la présence de *E. bienewisi* géotype A chez tous les enfants dépistés positifs indépendamment de leur statut VIH et de la présence d'une diarrhée associée, laissant supposer une transmission inter-humaine.

Trois autres séquences, non décrites dans la littérature et 100% homologues entre elles bien qu'apparemment apparentées au génotype B n'ont pu y être rapproché du fait d'une position nucléotidique différentes (transition A en G en position 31). Le génotype B, exclusivement humain et retrouvé dans plusieurs études et le génotype le plus souvent décrit en France (Liguory, Sarfati *et al.* 2001). Tout deux (A et B) sont connus pour être exclusivement anthroponotique, aucun portage animal n'ayant été observé. Au vu de ces résultats il semble que vu les génotypes isolés, l'origine de la contamination dans la population étudiée soit humaine.

Plusieurs études ont montré la présence du génotype K en Afrique (Gabon, Cameroun, Ouganda), mais aussi dans d'autres études chez les chats ou le bétail, il a été également retrouvé dans notre étude au Niger (x isolats). Ce génotype classiquement décrit comme anthropozoonotique est rare en France (Sarfati, Bourgeois *et al.* 2006).

Le génotype D, également isolé au Niger, a déjà été décrit au Gabon (Breton, Kombila *et al.* 2004). Ce génotype est présent en Europe et en Amérique du Sud chez l'homme mais aussi chez le singe, le porc, le renard, le castor.

**Au Vietnam**, sur 4 échantillons séquencés, les deux génotypes retrouvés sont D et E. La cinquième séquence non décrite dans la littérature diffère du génotype E par une seule base (transition G → A, en position 127)

Les deux génotypes D et E, identifiés dans différentes études, à la fois chez l'homme mais aussi chez les animaux, (transmission anthropozoonotique) ont été retrouvés au Vietnam. Les hôtes connus pour ces deux génotypes sont le singe, le porc, le renard, le castor, pour le génotype D mais seulement le porc, le castor pour le génotype E. La transmission zoonotique des microsporidies a souvent été évoquée hormis pour *E. cuniculi*, la preuve n'a jamais vraiment été apportée.

Un plus grand nombre de prélèvements positifs aurait été nécessaire pour envisager un possible transmission de l'animal à l'homme par exemple par le porc, animal très répandu au Vietnam autour des habitations (Figure 35)



**Figure 35 Présence des porcs en liberté aux alentours des habitations. Vietnam**

Les deux enfants inclus dans notre étude et hospitalisés à l'Hôpital Saint-Paul ne se sont pas avérés porteurs du même génotype (D et E) tout comme les deux patients du Centre de Bach Mai (D et E). Malgré le faible nombre de génotypes la transmission inter humaine semble peu probable. Dans les autres pays d'Asie du Sud Est, une seule étude de génotypage des microsporidies a été réalisée en Thaïlande, elle a montré l'existence du génotype A, le même retrouvé majoritairement au Niger.

Les populations étudiées sont différentes en Thaïlande et au Vietnam (enfants orphelins en Thaïlande et population générale au Vietnam). Ces deux études sont donc difficilement.

Les trois génotypes retrouvés **en France** ne peuvent pas être comparés.

L'enfant originaire d'Haïti, non séropositifs pour le VIH, était porteur d'un génotype proche du B (une base diffère) et identiques au trois autres séquences non décrites dans la littérature et retrouvées au Niger. Ce génotype strictement humain, retrouvé sur trois continents (Europe, Amériques, Afrique) semble donc cosmopolite.

Pour le patient « QUE », originaire de Bretagne, pour lequel nous rapportons un génotype proche du génotype K/IV/BEB5/Peru2, l'enquête familiale nous a renseigné sur la présence d'un chat dans l'entourage du patient. La séquence mise en évidence

quoique apparenté à ce dernier génotype déjà décrit chez l'homme mais également chez le chat et les bovidés diffèrent sur deux positions (citer les positions).-

Le dernier génotype isolé en France dans le cadre de cette étude est très différent des autres génotypes décrits jusqu'alors. Il a été isolé chez un patient immunodéprimé non VIH (transplanté rénal). L'analyse de la séquence nucléotidique révèle de manière surprenante, au moins 30 positions divergentes avec les séquences connues d'*E. bienewisi*. De plus, le fragment amplifié ne comporte 241pb (contre 243 dans la plupart des génotypes). Il s'agit d'un patient vivant de manière « écologique », en milieu rural et reclus dans une ferme, entouré d'animaux et sans téléphone. La transmission zoonotique pourrait donc être envisagée. La recherche des microsporidies dans les excréments des animaux de sa ferme aurait pu être intéressante.

Certains échantillons positifs en PCR temps réel *E. bienewisi* n'ont pas pu être séquencés. Plusieurs explications sont possibles, comme la présence de mutations dans les régions complémentaires des amorces sélectionnées pour la région ITS destinée au séquençage. Tous ces échantillons ont été isolés au Niger.

**Les populations étudiées au Niger, Vietnam et en France sont différentes**, en effet, la population incluse au Vietnam, plus large et moins ciblée puisqu'elle ne comportait que 20% de patients séropositifs pour le VIH. Au Niger l'étude a porté sur une population VIH pour la majorité sans traitement. En France la majorité des patients étaient séropositifs pour le VIH et sous traitement antirétroviral. Les populations étudiées étant distinctes, la comparaison des données de prévalences est hasardeuse. Malgré le faible nombre de génotypes isolés au Vietnam, on peut toutefois noter qu'ils diffèrent de ceux mis en évidence au Niger. L'impression générale qui se dégage de nos résultats semble est que la transmission des microsporidies au Vietnam et au Niger semble différentes mettant en jeu plutôt le réservoir animal au Niger alors que la transmission au Vietnam semble plutôt humaine. Les modes de transmission du SIDA peuvent peut être jouer un rôle dans la diversité des génotypes retrouvés (transmission essentiellement sexuelle au Niger alors qu'elle serait plutôt liée à l'usage de drogue IV au Vietnam).

D'autres études épidémiologiques dans différentes zones géographiques, sur de plus grands échantillons de patients VIH en Asie du Sud Est et en Afrique seraient

intéressantes afin d'évaluer plus précisément les possibilités de transmissions humaines ou zoonotiques des microsporidies. Des études ciblées sur les facteurs de risques associées aux microsporidies pourraient nous aider à définir plus clairement les origines des microsporidies dans l'environnement et les risques de transmissions associées.

L'analyse des génotypes réalisés dans cette étude, basée sur le séquençage de la région ITS de l'ADN ribosomal mais également ce qui ressort des études préalables disponibles dans la littérature révèle un l'extrême polymorphisme de l'espèce *E. bienensi*. En effet, parmi les 24 isolats mis en évidence 8 n'ont pu être raccrochés à aucune séquence préalablement décrite. La région ITS n'est peut être pas suffisamment conservé pour en conclure à un si grand nombre de génotypes différents.

***ANNEXES***

**Annexe 1 : Etudes sur la prévalence des infections à *E. bienensii* et *E. intestinalis* chez les patients infectés par le VIH (Mathis, Weber et al. 2005)**

Pays	Prélèvements examinés Méthodes de diagnostic	Nombre de patients Caractéristiques	Prévalence %	Année (références)
<b>AFRIQUE</b>				
Cameroon (Yaounde)	Selles, MO	66; diarrhée chronique	9	(Same-Ekobo, Lohoue et al. 1997)
Niger (Niamey)	Selles, MO	60; 41 avec diarrhée	7	(Bretagne, Foulet et al. 1993)
Zimbabwe (Harare)	Selles, MO	129; hospitalisés avec diarrhée	13	(van Gool, Luderhoff et al. 1995)
Zimbabwe	Selles formolées, PCR	74; 45 avec diarrhée	46	(Carville, Mansfield et al. 1997)
Zambie (Lusaka)	Selles, MO	69; diarrhée chronique	23	(Drobniewski, Kelly et al. 1995)
Mali (Bamako)	Selles, MO, ME	88; 80% avec diarrhée chronique	32	(Maiga, Doumbo et al. 1997)
Tanzanie	Selles, MO, ME	86; diarrhée	3	(Cegielski, Ortega et al. 1999)
Zimbabwe (Harare)	Selles, MO, PCR	88; diarrhée depuis plus d'une semaine	18 (MO), 51 (PCR)	(Gumbo, Sarbah et al. 1999)
Mali (Bamako)	Selles, MO, PCR, IFAT	61; diarrhée	13,1	(Alfa Cisse, Ouattara et al. 2002)
Guinea-Bissau	Selles, MO	52; VIH	11	(Lebbad, Norrgren et al. 2001)
<b>AMERIQUES</b>				
Etats-Unis (Washington DC)	Biopsies int., ME	67 ; diarrhée chronique inexpliquée	30	(Orenstein, Chiang et al. 1990)
EU (Texas)	Biopsies duod., ME	55 ; diarrhée chron. 51 ; sans diarrhée	33 25	(Rabeneck, Gyorkey et al. 1993)
EU (Atlanta)	Selles, MO	65 ; diarrhée 51 ; sans diarrhée	11 2	(Grohman, Glass et al. 1993)
EU (New-York)	Biopsies int., ME	34 ; patients SIDA 194 ; diarrhée	44 39	(Kotler, Giang et al. 1994; Kotler and Orenstein 1994)
EU (New-York)	Biopsies duod., ME, PCR	68 ; diarrhée	37	(Coyle, Wittner et al. 1996)
EU (Californie)	Selles, MO	8 439 ; diarrhée 1993,1994,1995,1996	8,8,9,7,6,6,2. 9	(Conteas, Berlin et al. 1998)
Brésil (Fortaleza)	Selles, MO	79 ; diarrhée 82 ; sans diarrhée	6 1	(Wuhib, Silva et al. 1994)
Brésil (Rio de Janeiro)	Selles, MO	13 ; diarrhée chroniques inexpliquée	46	(Brasil, Sodre et al. 1996)
Brésil (Rio de Janeiro)	Selles, biopsies duod.	40; diarrhée chronique	27.5	(Brasil, de Lima et al. 2000)
Perou (Lima)	Selles, MO	2 672; diarrhée	3.9	(Sulaiman, Bern et al. 2003)
Vénézuéla	Selles, MO	103; VIH	14%	(Chacin-Bonilla, Panunzio et al. 2006)
<b>ASIE-AUSTRALIE</b>				
Australie (New South West)	Biopsies duod., MO,ME	109; diarrhée chronique 71; sans diarrhée	29 1.4	(Field, Hing et al. 1993)
Australie (Victoria)	Selles, MO, ME	139; diarrhée	3.5	(Ryan, Sutherland et al. 1993)

Thaïlande	Selles, MO, ME	66; diarrhée chronique	33	(Wanachiwanawin, Manatsathit et al. 1998)
Thaïlande (Bangkok)	Selles, MO, ME	288; diarrhée	11	(Waywa, Kongkriengdaj et al. 2001)
Thaïlande	Selles, MO, ME	95; enfants avec diarrhée	25	(Wanachiwanawin, Chokeyphaibulkit et al. 2002)
Inde	Selles, MO	120; diarrhée	2.5	
<b>EUROPE</b>				
Pays Bas	Biopsies duod., MO, ME	55; diarrhée inexplicée 38 ; sans diarrhée	27 3	(Eeftinck Schattenkerk, van Gool et al. 1991)
Pays Bas	Selles, MO	143 ; diarrhée	7.7	(van Gool, Snijders et al. 1993)
France	Biopsies duod., MO	66 ; diarrhée chronique	2	(Cotte, Rabodonirina et al. 1993)
France (Paris)	Biopsies int., MO	18; diarrhée chron.inex	50	(Molina, Sarfati et al. 1993)
France (Nice)	Selles, MO	46 ; diarrhée chronique	24	(Bernard, Carles et al. 1995)
Italie	Selles, MO	56 ; diarrhée	2	(Marangi, Maggi et al. 1995)
Italie	Biopsies int., ME	72 ; diarrhée chronique	4.2	(Voglino, Donelli et al. 1996)
Allemagne (Cologne)	Biopsies int., PCR, SB, Hyb	46; diarrhée	22	(Franzen, Muller et al. 1996)
Allemagne (Hambourg)	Selles, MO	50 ; diarrhée 47 ; sans diarrhée	32 4	(Sobotka, Schwartz et al. 1998)
Angleterre (Londres)	Biopsies int., MO, ME	59; diarrhée	14	(Peacock, Blanshard et al. 1991)
Angleterre (nord-ouest)	Selles, biopsies int., MO, ME	63 ; diarrhée	14	(Kyaw, Curry et al. 1997)
Espagne (Madrid)	Selles, MO, PCR	48 enfants ; diarrhée chronique	2	(Del Aguila, Navajas et al. 1997)
Suède (Stockholm)	Biopsies duod., MO	72 ; symptômes abdo	3	(Svedhem, Lebbad et al. 1998)
Suisse	Selles, MO, ME, PCR	164 ; diarrhée chron 949 ; sans diarrhée	10.7 0.4	(Weber, Ledergerber et al. 1999)
Portugal	Selles, MO, PCR	215 ; diarrhée	42.8	(Ferreira, Bezerra et al. 2001)

MO : microscopie optique  
 SB : Southern Blot  
 Hyb : Htbridation  
 PCR : polymérase chain reaction

Duod : duodénales  
 IFAT : Immunofluorescent antibody test  
 ME : microscopie électronique  
 Int : intestinales

## **Annexe 2 : Technique de van Gool**

### Réactifs

Uvitex 2B  
 Tampon PBS  
 Bleu d'EVANS à 0,5% dans du tampon PBS

### Préparation du frottis

Prendre environ 1 gramme de selle  
Diluer dans 1 mL d'eau formolée à 10%  
Ajouter 4 mL d'eau distillée  
Homogénéiser  
Filtrer à travers trois couches de gaze  
Déposer 20 $\mu$ L de la suspension obtenue, sur une lame et étaler afin d'obtenir un spot de 1 cm de diamètre  
Laisser sécher  
Fixer au méthanol 2 minutes  
Laisser sécher

### Coloration du frottis

Colorer le spot en déposant une goutte d'Uvitex 2B à 1% dans du tampon PBS (conservé au réfrigérateur), pendant 10 minutes, à l'abri de la lumière  
Rincer la lame dans du PBS pendant 2 à 5 secondes, deux fois  
Contre colorer au Bleu d'Evans à 0,5% pendant 30 secondes  
Rincer la lame avec du PBS, pendant 2 à 5 secondes, deux fois  
Laisser sécher, à l'abri de la lumière

### Observation

Lecture au microscope à fluorescence à l'objectif 100  
Filtre d'excitation : 355 à 425 nm  
Filtre de suppression : 460 nm  
Lampe : 50 à 100 W

Conservation des lames à l'obscurité, si la lecture doit être différée.

## **Annexe 3 : Technique de Weber**

### Réactifs

Chromotrope 2R 6g  
Vert Lumière 0,15g  
Acide Phosphotungstique 0,70g                      **Trichrome**

Acide acétique glacial 3 mL  
Eau distillée 100 mL

Laisser agir 30 min  
Conservation 15 jours

Ethanol 95°  
Ethanol 100°  
Toluène  
Méthanol

#### Préparation du frottis

Prendre environ 1 gramme de selle  
Diluer dans 1 mL d'eau formolée à 10%  
Homogénéiser  
Déposer 10µL de la suspension sur une lame, étaler en frottis mince  
Laisser sécher  
Fixer au méthanol 5 minutes

#### Coloration

Colorer la lame dans la solution de trichrome pendant 90 minutes, à température ambiante  
Rincer à l'eau du robinet  
Différencier pendant 10 secondes dans l'alcool acétique (400 mL d'alcool à 90° avec 2 mL d'acide acétique)  
Déshydrater en plongeant la lame dans quatre bains successifs :

- Ethanol 95° 30 secondes
- Ethanol 95° 5 minutes
- Ethanol 100° 10 minutes
- Toluène 10 minutes

#### Observation

Lecture à l'immersion à l'objectif 100

### **Annexe 4 : Extraction d'ADN de selles**

#### **Coffret : QIAamp®DNA Stool Mini Kit**

- 1- Peser environ 200 mg de selles dans un tube de 2 mL  
Préparer un tube de 200µL d'eau en parallèle (témoin négatif d'extraction)

- 2- Ajouter 1,4 mL de ASL, vortexer 1 mn  
Chauffer la suspension à 95° pendant 5mn  
Vortexer 15s et centrifuger à 20000g pendant 2mn
- 3- Pipeter 1.2 mL de surnageant dans un tube de 2 mL et jeter le culot  
Ajouter l'inhibitablette à chaque échantillon et vortexer pendant 1mn  
Incuber la suspension à température ambiante 1 mn  
Centrifuger l'échantillon 3 mn à 20 000g
- 4- Pipeter le surnageant dans un nouveau tube et jeter le culot  
Centrifuger de nouveau 3 mn à 20 000g
- 5- Pipeter 15µL de Protéinase K dans un nouveau tube sérothèque  
Pipeter 200 µL de surnageant et mettre dans le tube précédent, y ajouter 200µL de tampon AL  
Vortexer 15s  
Incuber 10 mn à 70°
- 6- Ajouter 200 µL d'éthanol absolu au lysat et vortexer  
Prendre une colonne et y mettre le lysat  
Fermer le bouchon et centrifuger pendant 2 mn à 20 000g  
Placer la colonne dans un nouveau tube et jeter l'ancien, laisser la colonne ouverte quelques minutes pour évacuer l'éthanol.
- 7- Ajouter 500µL de AW1 et centrifuger 2 mn à 20 000g.  
Jeter le tube et en reprendre un nouveau
- 8- Ajouter 500 µL de AW2 sur la colonne et centrifuger 3 mn à 20 000g  
Jeter le tube
- 9- Transférer la colonne dans un tube Eppendorf et pipeter 200 µL de buffer AE directement sur la membrane de la colonne  
Laisser en contact 1 mn  
Centrifuger le tout 2 mn  
Récupérer l'ADN

## **Annexe 5 : PCR temps réel *Enterocytozoon bienewisi*, positions des amorces et sondes utilisées**

*Enterocytozoon bienewisi* small subunit ribosomal  
GenBank access AF024657

1 CACCAGGTTGATTCTGCCTGACGTAGATGCTAGTCTCTGAGATTAAGCCATGCATGTCAG

61 TGAAGCCTTACGGTGGAAACGGCGAACGGCTCAGTAATGTTGCGGTAATTTGGTCTCTGTG  
 121 TGTAACCTAACCCACGGTAACCTGTGGCTAAAAGCGGAGAATAAGGCGCAACCCTATCAGC  
 181 TTGTTGGTAGTGTAAGGACTACCAAGGCCATGACGGGTAACGGGAAATCAGGGTTTGTG  
 241 CCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTCCCACGTCCAAGGACGGCAGCAGGCGCGAAACT  
 301 TGTCCTCCTTACGGGGGAGACAGTCATGAGACGTGAGTATAAGACCTGAGTGTAAGA  
 361 CCTTAGGGTGAAGCAATTGGAGGGCAAGCTTTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAACCTCAACT  
 421 CCAAGAGTGTCTATGGTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTCGTGAATGCAATAAA  
 481 TGTCGTTGTTCAATAGCGATGAGTTTGCTAATGTTTGGGAACGGATAGGGAGTGTAGTA  
 541 TAGACTGGCGAAGAATGAAATCTCAAGACCCAGTTTGGACTAACGGAGGCGAAGGCGACA  
 601 CTCTTAGACGTATCTTAGGATCAAGGACGAAGGCAGGAGTATCGAAAGTGATTAGACACC  
 661 GCTGTAGTTCCTGCAGTAAACTATGCCGACAGCCTGTGTGTGAGAATACCGTGGGCGGGAG  
 721 AAATCTTAGTGTTCGGGCTCTGGGGATAGTACGCTCGCAAGGGTAAAACCTTAAAGCGAAA  
 781 TTGACGGAAGGACACTACCAGGAGTGGATTGTGCTGCTTAATTTAACTCAACGCGGGAAA  
 841 ACTTACCAGGGTCAAGTCATTCGTTGATCGAATACGTGAGAATGGCAGGAGTGGTGCATG  
 901 GCCGTTGGAAATTGATGGGGCGACCTTTAGCTTAAATGCTTAAACCAGTGAGACCTCCTT  
 961 GACAGGTGTTCTGTAACACAGGAGGGTGGAGGCTATAACAGGTCCGTGATGCCCTTAGAT  
 1021 ATCCTGGGCAGCAAGCGCAATACAATATCTCTTCAGTAGACAAAGTGATTTGAGATGAGT  
 1081 AGGATCTACGTTTGTAAATACGTAGTGAATAAGGAATTCCTAGTAACGGTGCCTCATCAA  
 1141 GGCATGGTGAATGTGTCCCTGTTCTTTGTACACACCGCCGTCACTATTTGAGATGGTCA  
 1201 TAGGGATGAAGAGCTTCGGCTCTGAATATCTATGGCTAGATAAAGTACAAGTCGTAACAA  
 1261 GGTTTCAGTTGG

en rouge : les primers

en bleu : la sonde

**Préparation du Mix :**

**Cycle de températures****REAL TIME PCR *E. bieneusi***Calcul des volumes  
et concentration

Nombre de tubes : 5

MIX DETECTION + IPC	concentration initiale			concentration finale		1 tube
TAMPON 10X	10	X	12,5	1	X	2,5
MgCL2 50mM	50	mM	15	<b>6</b>	<b>mM</b>	3
UDG	1	U	2,5	0,02	U	0,5
EB1	5		7,5	0,3		1,5
EB5	5		5	0,2		1
sonde EBS2	2		12,5	0,2		2,5
IPC Mix (primers et sonde)	10	X	12,5	1	X	2,5
IPC DNA50X Applied	50	X	1,25	0,5	X	0,25
dNTP AUCG Eurogentec	5	mM	5	0,2	mM	1
Taq platinum	5	U	0,5	0,02	U	0,1
eau			25,75			5,15
total =						20

Extrait DNA/tube	5	25
volume final/tube	25	125

- 1 cycle 50°C 2mn ( A supprimer si non utilisation d'UDG)
- 1 cycle 95°C 10mn
- 45 cycles
 

94°C	15 sec
60°C	60 sec

**Annexe 6 : PCR temps réel *E. intestinalis*,  
positions des amorces et sondes**

Septata intestinalis small subunit

GenBank access U09929

1 CACCAGTTGATTCTGCCTGACGTGGATGCTATTCTCTGGGACTAAGCCATGCATGTTGA  
 61 TGAACCTTGTGGGGGATTGACGGACGGCTCAGTGATAGTACGATGATTTGGTTGGCGGGA  
 121 GAGCTGTAAGTGCGGGAAACTGCAGGTAGGGGGCTAGGAGTGTTTTTGACACGAGCCAAG  
 181 TAAGTTGTAGGCCTATCAGCTGGTAGTTAGGGTAATGGCCTAACTAGGCGGAGACGGGAG  
 241 ACGGGGGATCGGGGTTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACTACGTCCAAGG  
 301 ATGGCAGCAGGCGCGAAACTTGCTAATCCTTTGGGGAGGCGGTTATGAGAAGTGAGTTT  
 361 TTTTCGAGTGTAAGGAGTCGAGATTGATTGGAGGGCAAGTCGGGTGCCAGCAGCCGCGG  
 421 TAATACCTGCTCCAATAGTGTCTATGGTGAATGCTGCAGTTAAAAAGTCCGTAGTCTTTT  
 481 GTATGTCTTTGTTGGGGGATTATGTCCTGATGTGGATGTAAGAGGTTTGGCAGAGGACG  
 541 GGGGCACCGGATAGTTGGGCGAGGGGTGAAATACGAAGACCCTGACTGGACGGACAGAA  
 601 GCGAAGGCTGTGCTCTTGGACTTATGTGACGATGAAGGACGAAGGCTAGAGGATCGAAAT  
 661 CGATTAGATACCGTTTTAGTTCTAGCAGTAAACGATGCCGACTGGACGGGACTATATAGT  
 721 GTTGTGCATGAGAAATCTTGAGTATGTGGGTTCTGGGGATAGTATGCTCGCAAGAGTGAA  
 781 ACTTGAAGAGATTGACGGAAGGACACCACAAGGAGTGGAGTGTGCGGCTTAATTTGACTC  
 841 ACGCGGGGCAACTTACCGGTTCTGAAGCGGGCAGGAGAACGAGGACGGGATGCGCGCGG  
 901 CGGTGGTGCATGGCCGTTTAAAATGGATGGCGTGAGCTTTGGATTAAGTTGCGTAAGATG  
 961 TGAGACCCTT **TGACAGTGCTCTTTGGGGCAA**GGGAGGAATGGAACAGAACAGGTCCGTTA  
 1021 GCCC **TGAGATGAAGCGGGC**GGCACGCGCACTACGATAGATGGCGAGGGAGCCTGCTGTG  
 1081 AG **GGATGAAGCTGTGTAATGGGCT**TTCTGAACGTGGAATTCCTAGTAATAACGATTGAACA  
 1141 AGTTGTTTTGAATGGGTCCCTGTCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTATCTAAGATGACG  
 1201 CAGTGGACGAAGATTGGAAGGTCTGAGTCCTTCGTGTTAGATAAGATATAAGTCGTAACA  
 1261 TGGCTGCTGTTGGAGAACCATTAGCAGGATCATAA

**en rouge** : les primers

**en bleu** : la sonde

**Préparation du Mix :**

REAL TIME PCR *E. intestinalis*

Calcul des volumes et concentration

Nombre de tubes : 5

MIX DETECTION + IPC	concentration initiale			concentration finale		1 tube
TAMPON 10X	10	X	12,5	1	X	2,5
MgCL2 50mM	50	mM	15	<b>6</b>	<b>mM</b>	3
UDG	1	U	2,5	0,02	U	0,5
FEI1	5		5	0,2		1
REI1	5		5	0,2		1
Sonde intes	5		10	0,4		2
IPC Mix (primers et sonde)	10	X	12,5	1	X	2,5
IPC DNA50X Applied	50	X	1,25	0,5	X	0,25
dNTP AUCG	5	mM	5	0,2	mM	1
Taq platinum	5	U	0,5	0,02	U	0,1
eau			30,75			6,15
total =						20
Extrait DNA/tube			5			25
volume final/tube			25			125

**Cycle de températures**

- 1 cycle 50°C 2mn ( A supprimer si non utilisation d'UDG)
- 1 cycle 95°C 10mn
- 45 cycles  $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} \ 15 \ \text{sec} \\ 63^{\circ}\text{C} \ 60 \ \text{sec} \end{array} \right.$

**Annexe 7 : PCR classique *Enterocytozoon bienersi*,  
préparation du Mix**

Calcul des volumes et concentration

Nombre de tubes :	5
-------------------	---

MIX DETECTION + IPC	concentration			concentration	
		initiale		finale	1 tube
TAMPON	10	X	5	1	X
MgCL2	25	mM	5	2.5	mM
MSP4B	10		5	1	
MSP3	10		5	1	
dATP	2	mM	5	0,2	
dCTP	2	mM	5	0,2	
dTTP	2	mM	5	0,2	
dGTP	2	mM	5	0,2	
Taq polymérase	5	U/L	0,3	0,05	
eau			4,7		
				total =	45

Extrait DNA/tube		5	25
volume final/tube		50	125

### Cycle de températures

Dénaturation 94°C, 2 minutes, 1 cycle

30 cycles :

- Dénaturation à 94°C, 1 minute
- Phase d'hybridation à 58°C, 1 minute
- Phase d'élongation à 72°C, 1 minute

Extension 72°C, 4 minutes, 1 cycle

## Annexe 8 : Gel pour électrophorèse des produits de PCR

La visualisation des produits d'amplification obtenus par PCR se fait grâce à :

- L'électrophorèse des produits d'amplification dans un gel de polyacrylamide à 9 % (120 volts pendant 1h15 )
- La visualisation sous lampe UV après avoir laissé tremper les gels dans une solution de BET (5-10min.)

1. Tampon utilisé pour l'électrophorèse, et la fabrication du gel = TBE 10X

<b>TBE 10X</b>	[	Tris Base	54 g
		Acide Borique	27,5 g
		EDTA	4,65 g
		H2O distillée	qsp 1 l

2. Solution pour gel de polyacrylamide à 9% :

Sol° Acrylamide bisacryl 37,5/1 9%	[	Acrylamide 37,5/1 40%	112ml
		TBE 10X	50 ml
		Eau distillée	qsp 500ml

3. Gel de polyacrylamide à 9%

Pour un gel (1 plaque)	[	Acrylamide bis acryl 37,1/1 9%	10 ml
		Ammonium persulfate	100 µl
		TEMED	10 µl

*Laisser polymériser 15 minutes*

⇒ **Procédure :**

Préparer les deux plaques de verre avec les espaceurs et placer deux pinces à ce niveau.

Dans un tube de 10mL (bouchon rouge) mélanger :

10mL d'acrylamide+100µL de persulfate+10µL de Temed

Agiter par retournement.

Couler les gels entre 2 plaques de verre et placer le peigne permettant de créer les puits pour les dépôts. Garder la fin du tube comme témoin de polymérisation.

Attention aux bulles !

Attendre la polymérisation des gels

Placer le gel avec les plaques d'un côté de la cuve de migration, fixer avec deux pinces.

Mettre en face une plaque seule plus pinces.

TBE 1X au centre et en bas de la cuve. Enlever le peigne.

Sur un film de Parafilm® faire 8 dépôts de tampon de chargement de 2µL

Déposer dans le 1<sup>er</sup> puits le marqueur V

Déposer les échantillons dans les puits : **6 µl de produit de PCR mélangé au tampon de chargement**

Faire migrer à 120 volts jusqu'en bas du gel (environ 1h)

Placer les gels dans une solution de bromure d'éthidium pendant 15 minutes (révélation).

Visualisation sous lumière UV.

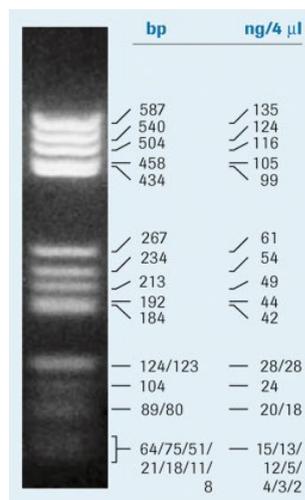


Figure 36. Marqueur de poids moléculaire V de 8 à 587 pb. Roche®

## Annexe 9 : PCR temps réel *Enterocytozoon bienewisi* GBEA

Laboratoire de PARASITOLOGIE	MODE OPERATOIRE	MO-TEC 113	
---------------------------------	-----------------	------------	--

Hôtel Dieu CHU NANTES	<b>PCR MICROSPORIDIES (ENTEROCYTOZON BIENEUSI)</b>	Rév. B	Page126/ 182
--------------------------	--	--------	-----------------

**I OBJET**

PCR Microsporidies en temps réel

**II DOCUMENTS DE REFERENCE :**

Manuel des 222 exigences du GBEA (JO 11 décembre 1999)

**III DOMAINE D'APPLICATION :**

S'adresse aux techniciens de laboratoire ayant une formation en biologie moléculaire.

**IV PREPARATION D'UN MIX**

A préparer dans une pièce « blanche » avec du matériel strictement réservé à cet usage, utilisation de cônes à filtres, gants, etc...

La réserve des différents composants est stockée dans le congélateur du secteur 1 (locaux PCR)

- Séquences des amorces

EB.1 : 5' CGA CAG CCT GTG TGT GAG AAT AC 3'

EB.5 : 5' CAA CGA ATG ACT TGA CCC TGG TAA 3'

- Séquence cible

Petite sous unité 16S de l'ARNr d'Enterocytozoon bienensii

- Longueur du fragment amplifié : 180pb

- Sonde taqman EBS2 :

**5' FAM** TGC TGC TTA ATT TAA CTC AAC GCG GGA AAA **3'TAMRA**  
quencher reporter

- Contrôle interne : IPC (APPLERA France)

- Exogenous Internal Positif Control Reagents

- Taq DNA Polymerase Platinum ® ( Invitrogen)

- Utilisation éventuelle d'UDG

- d NTP : A C G U reçus à 100mM, utilisés à 2,5mM

	Concentration finale	Quantité 1tube	4tubes
TAMPON 10X	1X	2,5	10
MG CL2 50mM	6mM	3	12
DNTP 5mM	0.2mM	1	4
SONDE EBS2 2µM	0.2µM	2,5	10
EB1 5µM	0.3µM	1,5	6
EB5 5µM	0.2µM	1	4
IPC MIX 10X	1X	2,5	10
ADN 1/100		0,25	1
EAU DIST,		5,15	20,6
TAQ PLATINUM	0.02U	0,1	0,4
UDG (Promega)	0.02U	0,5	2
TOTAL MIX		20	80
EXTRAIT ADN		5	
TOTAL PCR		25	

### V MODE OPERATOIRE :

Pour chaque manip. :

- prévoir deux tubes pour un patient : pur et 1/10
- Témoin d'extraction
- Témoin positif

1) Préparer un lit de glace et y placer les tubes vides numérotés.

Décongeler un aliquot de mix et y ajouter le volume nécessaire d'enzyme  
Agiter manuellement et distribuer 20µl par tube

2) Les extraits d'ADN et témoins seront ajoutés dans la pièce de coprologie avec une pipette  
« dépôt ADN »

3) Placer vos tubes sur le Rotor Gene (cf MO-419 p :5)  
Choisir le programme adéquat

- 1 cycle 50°C 2mn ( A supprimer si non utilisation d'UDG)
- 1 cycle 95°C 10mn
- 45 cycles 

94°C 15 sec	Acquisition FAM 470 / 510 nm
60°C 60 sec	

 TAMRA 530 / 555 nm

## Annexe 10 : Détermination de la concentration optimale en MgCl<sub>2</sub>

Quantitation Report  
Experiment Information

Experiment Name	Eintestinalis
Experiment Start	17:42:47
Experiment Finish	19:32:36
Operator	anne
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 5.0.60
Gain FAM/Sybr	4
Gain VIC	7
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Noise Slope Correction	Yes
Start normalising from cycle	5
Digital Filter	Light
Threshold	0,02
Left Threshold	1
Standard Curve	N/A
No Template Control Threshold	10,0% (1,512FI)
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Experiment Signature	The Experiment Signature is valid.

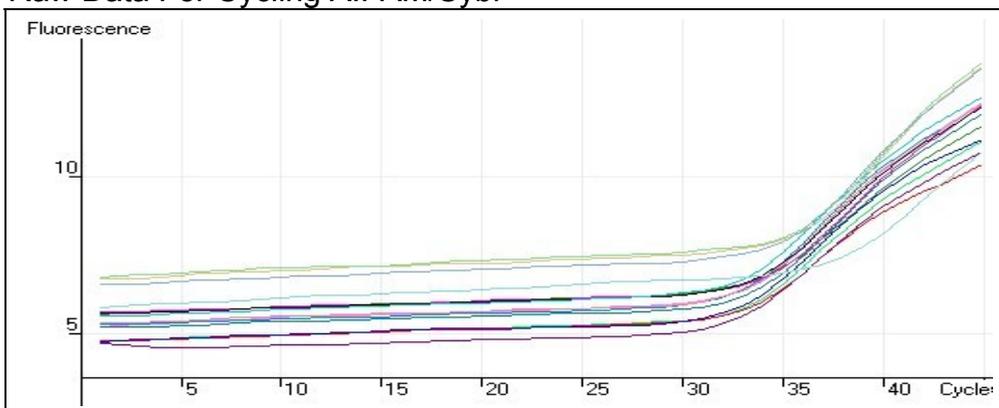
### Messages

#### Message

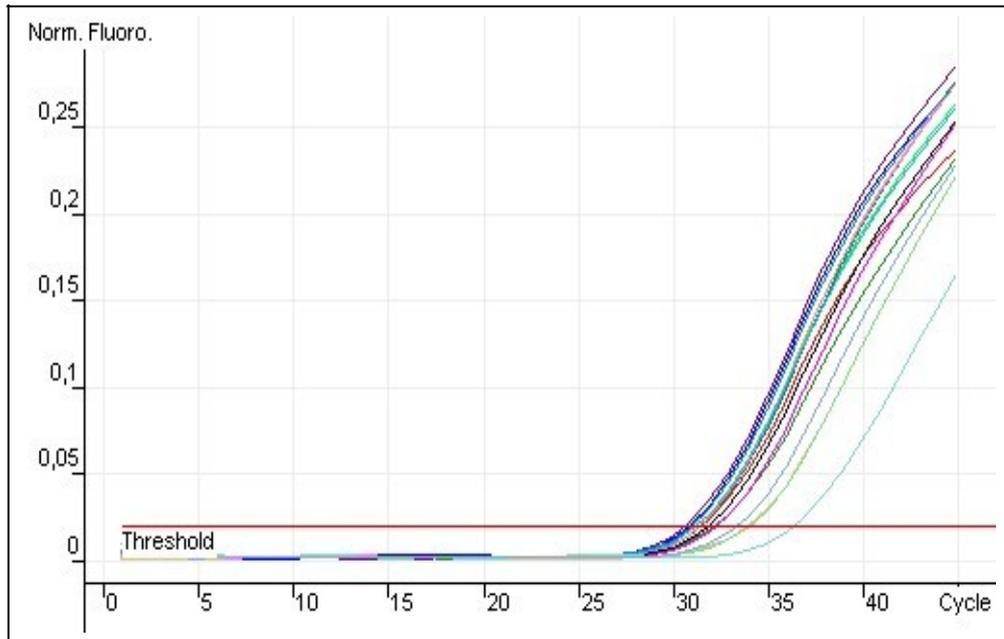
### Temperature Profile

Cycle	Cycle Point
Hold @ 50 deg., 2 min 0 secs	
Cycling (1 repeats)	Step 1 @ 95 deg., hold 600 secs
Cycling 2 (45 repeats)	Step 1 @ 95 deg., hold 15 secs
	Step 2 @ 65 deg., hold 60 secs, acquiring to Cycling A(FAM/Sybr, VIC)

### Raw Data For Cycling A.FAM/Sybr



### Quantitation data for Cycling A.FAM/Sybr



No.	Colour	Name	Type	Given Conc. (Copies)	Calculated Conc. (Copies)	% Variation	Ct	Ct Std. Dev.
1	Green	MgCl2 6 917	Sample				31,67	
2	Red	id	Sample				31,73	
3	Blue	id	Sample				31,07	
4	Purple	id	Sample				30,83	
5	Magenta	5i	Sample				31,41	
6	Cyan	id	Sample				31,16	
7	Teal	id	Sample				31,63	
8	Red	id	Sample				31,62	
9	Green	4	Sample				32,35	
10	Magenta	id	Sample				32,48	
11	Black	id	Sample				32,05	
12	Cyan	id	Sample				31,42	
13	Yellow	3	Sample				34,13	
14	Green	id	Sample				34,23	
15	Teal	id	Sample				36,51	
16	Blue	id	Sample				33,52	

This report generated by Rotor-Gene Real-Time Analysis Software  
 (C)Corbett Research 2000  
 (R)All Rights Reserved

**Annexe 11 : Résultats des échantillons du Vietnam (H), Niger (N) et de France**

*a) Résultats Vietnam*

Référence	Hôpital	Sexe	Age	Adresse	Statut Immunitaire	Diarrées	aspect	fièvre	Remarques	IF+Weber
H1	Dong Da	M	36	Tu Liem HANOI	HIV +	oui	molle	nr		N
H2	Dong Da	M	28	Thanh Xuan HANOI	HIV +	oui	molle	nr		N
H3	Dong Da	F	26	Thanh Xuan HANOI	?	oui	liquide	nr		P
H4	Dong Da	M	24	Hai Ba Trung HANOI	HIV +	nr	molle	nr		N
H5	Dong Da	F	75	Trung Liet DONG DA	?	nr	liquide	nr		N
H6	Dong Da	M	24	Hai Ba Trung HANOI	HIV +	nr	molle	nr		N
H7	Bach Mai 1	M	38	nr	HIV +	nr	molle	nr		N
H8	Bach Mai 1	M	40	nr	HIV +	nr	molle	nr		N
H9	Dong Da	F	66	nr	?	oui	liquide	nr		P
H10	Dong Da	F		nr	?	nr	liquide	nr		N
H11	Dong Da	M		nr	?	nr	liquide	nr		N
H13	Enfants	F	<1	MY HAO, Hung Yen	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H14	Enfants	M	<1	Gia Lam HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H15	Enfants	F	1	Tu Liem HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H16	Enfants	F	<1	HAI DUONG	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H17	Enfants	M	3	Tay Ho HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H18	Enfants	M	3	Tay Ho HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H19	Français	F		nr	?	oui	liquide	nr	Etranger	N
H20	Français	F	<1	nr	?	nr	liquide	oui		N
H21	Français	M	27	nr	?	oui	liquide	nr	Etr-France	N
H22	Français	M	32	nr	?	oui	liquide	nr	Etr-Japon	N
H23	Français	M	32	nr	?	oui	liquide	nr	Etranger	N
H24	Français	F	25	nr	HIV+	oui	liquide	nr		N
H25	Bach Mai 2	M	24	Lam Son BAC KAN	SLE 4 ans	nr	nr	oui	Corticothérapie	N
H26	Bach Mai 2	F	22	Hong Bang HAI PHONG	SLE 1 ans	oui	nr	oui	Corticothérapie	N
H27	Bach Mai 2	M	51	Gia Lam HANOI	Sclerodermie	nr	nr	oui	Corticothérapie	N
H28	Bach Mai 2	F	40	Yen Lac VINH PHUC	Sclerodermie	oui	nr	oui	Corticothérapie	N
H29	Bach Mai 2	F	17	Nghi Xuan HA TINH	SLE 4 ans	nr	nr	nr	Corticothérapie	N
H30	Bach Mai 2	F	38	NAM DINH	SLE 4 ans	oui	molle	nr	Cortico+ IS	P
H31	Dong Da	M		nr		oui	liquide	nr	Maladie contagieuse	P
H32	Bach Mai 2	F	45	Ky Son HOA BINH	SLE 8 ans	oui	nr	nr	Corticothérapie	P
H33	Bach Mai 2	F	23	Tan Hoa HOA BINH	SLE 4 ans	oui	nr	oui	Corticothérapie	N
Référence	Hôpital	Sexe	Age	Adresse	Statut Immunitaire	Diarrées	aspect	fièvre	Remarques	IF+Weber

H34	Bach Mai 2	F	19	Phu Cu HUNG YEN	SLE 3 ans	oui	nr	oui	Corticothérapie	N
H35	Bach Mai 2	F	36	Nam Dan NGHE AN	SLE 10 ans	oui	nr	oui	Corticothérapie	P
H36	St Paul	F	2	Lac Long Quan HANOI	?	oui	nr	nr		N
H37	St Paul	M	1	Thanh Nhan HANOI	?	oui	nr	nr	Allaitement	N
H38	St Paul	M	0,5	Bui Ngoc Duong	?	oui	nr	nr	Allaitement	N
H39	St Paul	M	2	Gia Lam HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H40	St Paul	M	<1	Long Bien HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H41	St Paul	M	1,5	Ba Dinh HANOI	?	oui	nr	nr	Allaitement	N
H42	St Paul	F	1	Tu Liem HANOI	?	oui	nr	nr	Allaitement	N
H43	St Paul	M	0,5	Dong Anh, HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H44	St Paul	F	1	Thanh Xuan HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H45	St Paul	M	1,8	Linh Dam HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H46	St Paul	F	<1	Duong Giai Phong HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H47	St Paul	M	1	Long Bien HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H48	St Paul	M	0,5	Thanh Xuan HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H49	St Paul	F	3	To Hoai HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H50	St Paul	M	2	Thanh Tri HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H51	St Paul	M	2	Thanh Xuan HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H52	St Paul	M	1	Tu Liem HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H53	Bach Mai 1			nr	HIV+	nr	liquide	nr		N
H54	Inst militaire	M	34	HOA BINH	HIV+	oui	molle	nr	CD4 = 75 mm3,cand buc	P
H55	Bach Mai 1	F		nr	HIV+	nr	nr	nr		N
H56	Bach Mai 1	M		nr	HIV+	nr	nr	nr		P
H57	Bach Mai 1	F		nr	HIV +	nr	nr	nr		N
H58	Bach Mai 2	F	35	An Thi HUNG YEN	SLE 3 ans	nr	nr	oui	contact porc et poulet	P
H59	Bach Mai 2	F	43	KON TUM	SLE 4 ans	nr	nr	oui	Corticothérapie	P
H60	Bach Mai 2	F	14	My Duc HA TAY	SLE	nr	nr	oui	Corticothérapie	N
H61	Bach Mai 2	F	16	My Duc HA TAY	?	nr	nr	oui	Corticothérapie	P
H62	Bach Mai 2	F	58	Phuong Mai HANOI	SLE 5 ans	nr	nr	oui	Corticothérapie	N
H63	Bach Mai 2	F	34	Yen Lac VINH PHUC	SLE 2 ans	nr	nr	oui	Corticothérapie	N
H64	Bach Mai 2	F	23	Dong Da HANOI	SLE 3 ans	oui	nr	oui	Corticothérapie	N
H65	Bach Mai 2	F	28	Dang Xa Gia Lam HANOI	Hypothrombo 10 ans	oui	molle	oui	Corticothérapie	N
H66	Bach Mai 2	F	30	Dong Da HANOI	SLE 14 ans	nr	moulé	oui	Corticothérapie	P
<b>Référence</b>	<b>Hôpital</b>	<b>Sexe</b>	<b>Age</b>	<b>Adresse</b>	<b>Statut Immunitaire</b>	<b>Diarrées</b>	<b>aspect</b>	<b>fièvre</b>	<b>Remarques</b>	<b>IF+Weber</b>
H67	Bach Mai 2	F	27	Vinh Tin TP VINH	SLE 2 ans	oui	molle	oui	Corticothérapie	P

Annexes

H68	Bach Mai 2	M	34	Kiem Lam HANOI	SLE	nr	molle	oui	A faire traduire	N
H69	Bach Mai 2	F	45	PHU THO	SLE 6 ans	nr	nr	nr		P
H70	Bach Mai 2	F	16	Yen My HUNG YEN	SLE 2 ans	oui	molle	oui		P
H71	Bach Mai 2	F	20	Nguyen Phuc YEN BAI	SLE 2 ans	nr	liquide	oui		P
H72	Bach Mai 2	F	38	To Hieu, SON LA	SLE 6 mois	nr	molle	oui		N
H73	Bach Mai 2	F	16	Ha Hoa PHU THO	?	nr	moulé	oui	Epilepsie + cortico	P
H74	Bach Mai 2	F	14	Ba Vi HA TAY	SLE 1 an	oui	molle	oui	Corticotherapie	N
H75	Bach Mai 2	F	27	THANH HOA	?	nr	nr	oui	Tracheo + Cortico	P
H76	St Paul	M	<1	Thanh Tri HANOI	?	oui	molle	oui	Allaitement	N
H77	St Paul	F	<1	Gia Lam HANOI	?	oui	blanche	oui	Allaitement	N
H78	St Paul	M	<1	Ba Dinh HANOI	?	oui	blanche	oui	Allaitement	N
H79	St Paul	M	<1	Soc Son HANOI	?	nr	blanche	nr	Allaitement	N
H80	St Paul	M	<1	Ba Dinh HANOI	?	oui	blanche	oui	Allaitement	N
H81	St Paul	M	1	Hai Ba Trung HANOI	?	oui	molle	nr	Allaitement	N
H82	Bach Mai 2	F	30	Tay Ho HANOI	?	nr	nr	oui	Corticotherapie	P
H83	Bach Mai 2	M	43	Yen The BAC GIANG	?	nr	nr	nr	Alcoolisme	N
H84	Bach Mai 2	F	18	Dong Hung THAN BINH	?	nr	nr	oui	Cortico + Synd Reynaud	N
H85	Bach Mai 2	F	17	Yen Thuong HOA BINH	SLE 2 ans	nr	nr	oui	Corticotherapie	P
H86	Bach Mai 1	M	30	QUANG NINH	HIV +	non	liquide	non	CD4 = 500 mm3	P
H87	St Paul	M	1	nr	?	nr	blanche	nr	Allaitement	N
H88	St Paul	M	1	Kim No Dong An h HANOI	?	nr	blanche	nr	Allaitement	N
H89	Bach Mai 2	M	46	Viet Yen BAC GIANG	SLE	nr	nr	oui		P
H90	Bach Mai 2	F	18	Minh Phuong VIET TRI	SLE	oui	nr	oui	Corticotherapie	N
H91	Bach Mai 2	F	15	Duc Giang LONG BIEN	SLE 2 ans	nr	nr	oui	Corticotherapie	N
H92	Bach Mai 2	F	61	Que Vo BAC NINH	SLE 2 ans	nr	nr	oui	Corticotherapie	N
H93	St Paul	M	<1	Dong Da HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H94	St Paul	M	12	Hoan Kiem HANOI	?	oui	nr	oui		N
H95	St Paul	M	1,5	Hoan Kiem HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H96	St Paul	F	1,5	Tu Liem HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H97	St Paul	F	1,5	Hai Ba Trung HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H98	St Paul	F	1,5	Gia Lam HANOI	?	nr	blanche	nr		P
H99	St Paul	M	1	Dong Anh HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
<b>Référence</b>	<b>Hôpital</b>	<b>Sexe</b>	<b>Age</b>	<b>Adresse</b>	<b>Statut Immunitaire</b>	<b>Diarrées</b>	<b>aspect</b>	<b>fièvre</b>	<b>Remarques</b>	<b>IF+Weber</b>
H100	St Paul			nr	?	nr	blanche	nr		P
H101	St Paul	M	1	Tu Liem HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H102	St Paul	M	2,5	Dong Da HANOI	?	nr	nr	nr		N

Annexes

H103	St Paul	M	<1	Kim Lu SOC SON	?	nr	liquide	nr		N
H104	St Paul	M	2	Tay Ho HANOI	?	oui	liquide	oui		N
H105	St Paul	M	<1	Dong Da HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	P
H106	St Paul	F	1,5	Hai Ba Trung HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H107	St Paul	M	13	Thanh Xuan HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H108	St Paul	M	<1	Tranh Tri HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	P
H109	St Paul	M	2	Thanh Xuan HANOI	?	nr	nr	nr		N
H110	Ba Vi	F	31	Dong Da HANOI	HIV	nr	molle	nr		P
H111	Ba Vi	F	28	Hoan Kiem HANOI	HIV	nr	glaire	nr		N
H112	Ba Vi	F	20	Tay Ho HANOI	HIV	nr	liquide	nr		P
H113	Ba Vi	F	24	Hai Ba Trung HANOI	HIV	nr	moulé	nr		N
H114	Ba Vi	F	27	BAC GIANG	HIV	nr	aqueuse	nr		P
H115	St Paul	M	<1	Hoan Kiem HANOI	?	nr	laiteuse	nr	Allaitement	N
H116	St Paul	F	2	Dong Da HANOI	?	oui	liquide	oui		N
H117	St Paul	F	1	Gia Lam HANOI	?	nr	nr	nr	Corticotherapie	N
H118	St Paul	F	2	Cau Giay HANOI	?	nr	nr	nr		N
H119	Bach Mai 2	F	29	Hai Duong NAM DINH	SLE diag	oui	moulé	oui		N
H120	Bach Mai 2	F	36	Doan Hung PHU THO	SLE 2 ans	oui	moulé	nr	Arthralgie + Med //	P
H121	Bach Mai 2	F	27	Gia Loc HAI DUONG	SLE 3 ans	oui	nr	nr	Corticotherapie	P
H122	Bach Mai 2	F	21	Tan Hoa HOA BINH	SLE 5 ans	nr	molle	oui	Forte corticotherapie	?
H123	Bach Mai 2	F	36	Doan Hung PHU THO	SLE 2 ans	oui	molle	oui	cf 05.02.120	P
H124	Bach Mai 2	M	62	Nguyen Van Phuc HANOI	?	nr	moulé	oui	Fievre pdt 3 mois	P
H125	Bach Mai 2	F	25	Vu Ban NAM DINH	SLE 6 ans	nr	molle	oui	Corticotherapie	P
H126	St Paul	M	<1	Dong Anh HANOI	?	nr	nr	nr		N
H127	St Paul			nr		nr	nr	nr	Pas fiche epidemio 22/03	D
H128	St Paul	M	<1	Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		N
H129	St Paul	M	<1	Dong Da HANOI	?	nr	nr	nr		N
H130	Bach Mai 1	F	23	QUANG NINH	HIV	non	molle	non	CD4 = 500 mm3	P
H131	Bach Mai 1			nr	HIV	nr	liquide	nr		N
H132	Bach Mai 2	F	44	Ba Vi HA TAY	?	oui	molle	oui	Corticotherapie	N
<b>Référence</b>	<b>Hôpital</b>	<b>Sexe</b>	<b>Age</b>	<b>Adresse</b>	<b>Statut Immunitaire</b>	<b>Diarrées</b>	<b>aspect</b>	<b>fièvre</b>	<b>Remarques</b>	<b>IF+Weber</b>
H133	Bach Mai 2	F	35	Hoan Kiem HANOI	?	nr	nr	nr		N
H134	Bach Mai 2	F	22	Kim Bang HA NAM	?	nr	molle	oui	Fievre pdt 1 mois	P
H135	Bach Mai 2	F	43	Chuong My HA TAY	?	nr	nr	oui		N
H136	Ba Vi	M	32	Hoang Mai HANOI	HIV	oui	glaire	oui		P
H137	Ba Vi	F	29	Hoai Duc HA TAY	HIV	oui	aqueuse	oui		N

Annexes

H138	Ba Vi	F	26	Dong Da HANOI	HIV	oui	aqueuse	oui		N
H139	Ba Vi	F	28	Chien Hoa TUYEN QUANG	HIV	oui	aqueuse	oui		N
H140	Bach Mai 1	M	23	THANH HOA	HIV	oui	pateuse	oui	CD4 = 400 mm3	P
H141	Bach Mai 1			nr	HIV	nr	liquide	nr		N
H142	Bach Mai 1			nr	HIV	nr	pateuse	nr		N
H143	Bach Mai 1	M	27	HAI PHONG	HIV	nr	nr	nr	CD4 = 500 mm3	P
H144	Bach Mai 2	M		Hai Ba Trung HANOI		oui	molle	oui	S J synd + tuberculose + hepatite alcoolique	N
H145	Bach Mai 2	M	25	THANH HOA	Sclerodermie	nr	liquide	oui	Corticotherapie	N
H146	Bach Mai 2	F		PHU THO	?	nr	pateuse	oui	fièvre depuis 3 semaines	N
H147	Bach Mai 2	F		Thanh Ha HAI DUONG	SLE 5 ans	oui	moule	oui	S J synd + Lyell+ cortico + antiallergique	N
H148	Bach Mai 2	F		Thanh Tri HANOI	SLE 9 mois	nr	nr	oui	Corticotherapie	P
H149	St Paul	F	1	Hai Ba Trung HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H150	St Paul	M	< 1	Thanh Xuan HANOI	?	oui	nr	oui	Allaitement	N
H151	St Paul	M	0,5	Bong Den HANOI	?	nr	nr	nr		N
H152	St Paul	F	1	Gia Lam HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H153	St Paul	M	<1	Xuan Dinh TU LIEM	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H154	St Paul	M	<1	Hoang Mai HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H155	St Paul	M	1,5	Nam Dong HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H156	St Paul	F	<1	Ong ich Khiem HANOI	?	nr	nr	nr	Allaitement	N
H157	Ba Vi	F	30	Tu Liem HANOI	HIV	nr	liquide	nr		P
H158	Ba Vi	F	33	HOA BINH	HIV	nr	nr	nr	Ascaris	N
H159	Ba Vi	F	22	Thanh Tri HANOI	HIV	nr	liquide	nr	Douteux	D
H160	Ba Vi	F	29	Nam Truc NAM DINH	HIV	nr	pateuse	nr		P
H161	Ba Vi	F	31	Ha Long QUANG NINH	HIV	nr	liquide	nr		P
H162	Français	F	<1	nr	?	nr	liquide	nr		N
H163	Français	M	36	nr	?	nr	liquide	nr	Etranger	N
Référence	Hôpital	Sexe	Age	Adresse	Statut Immunitaire	Diarrées	aspect	fièvre	Remarques	IF+Weber
H164	Bach Mai 1	M		nr		nr	pateuse	nr		N
H165	Inst militaire	M		nr		nr	pateuse	nr		D
H166	Bach Mai 1	M	32	HUNG YEN	HIV	nr	pateuse	nr	Tres positif cd4 198	P
H167	Bach Mai 1	M	35	HUNG YEN	HIV	oui	moulé	oui	CD4 81	P
H168	St Paul	M	49	Gia Lam HANOI	?	nr	glairé	nr		D
H169	St Paul	M	35	Cau Giay HANOI	?	nr	nr	nr		N
H170	St Paul	F	6	Doi Can Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		N

H171	St Paul	M	8	Thai Thinh Dong Da HANOI	?	nr	nr	nr		N
H172	St Paul	F	4	Doi Can Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		N
H173	St Paul	F	3	Dong Da HANOI	?	nr	nr	nr	Tres positif	P
H174	St Paul	M	4	Kim Ma Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		N
H175	St Paul	F	6	Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		D
H176	St Paul	M	4	Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		P
H177	St Paul	M	4	Hai Ba Trung HANOI	?	nr	nr	nr		D
H178	Francais	M	28	nr		oui	pateuse	nr		N
H179	Francais	F	2	nr		nr	pateuse	nr		N
H180	Ba Vi	F	36	Cau Giay HANOI	HIV	nr	liquide	oui		P
H181	Ba Vi	F	24	Hoang Mai HANOI	HIV	nr	liquide	nr	Peu de selles- juste frottis	N
H182	Ba Vi	F	34	Thanh Tri HANOI	HIV	nr	nr	nr	Selles pleine de vers	P
H183	Ba Vi	F	31	Luong Son HOA BINH	HIV	nr	nr	oui	Pas assez de selles	
H184	Ba Vi	F	28	Sam Son THANH HOA	HIV	nr	nr	nr	Peu de selles mais beaucoup de vers- juste frottis	N
H185	St Paul	M	1	Tan Mai , HANOI	?	oui	nr	oui		N
H186	St Paul	M	1,5	Dong Da HANOI	?	oui	nr	oui		N
H187	St Paul	M	3	Dong Da, HANOI	?	oui	nr	oui		P
	St Paul	M	19	Ba Dinh HANOI	?	oui	nr	oui		N
H189	St Paul	F	4	Thanh Xuan HANOI	?	oui	nr	oui		N
H190	St Paul	F	1	Phuc Tan Hoan Kiem HANOI	?	nr	nr	nr		P
H191	St Paul	M	15	Ba Dinh, HANOI	?	nr	nr	nr		N
H192	St Paul	F	1	Hoan Kiem HANOI	?	oui	nr	nr		N
H193	St Paul	M	7	Hai Ba Trung HANOI	?	oui	nr	nr		N
H194	St Paul	M	1,5	Dong Da HANOI	?	nr	nr	oui		P
Référence	Hôpital	Sexe	Age	Adresse	Statut Immunitaire	Diarrées	aspect	fièvre	Remarques	IF+Weber
H195	St Paul	F	1,5	Hoan Kiem HANOI	?	oui	nr	nr		N
H196	St Paul	F	1	Ba Dinh HANOI	?	oui	nr	oui		N
H197	St Paul	M	9	Dong Da HANOI	?	oui	nr	oui		N
H198	St Paul	M	0,5	Hai Ba Trung HANOI	?	oui	nr	oui		P
H199	St Paul	M	<1	Hai Ba Trung HANOI	?	nr	nr	nr		P
H200	Inst militaire	M	nr	nr	HIV	nr	nr	nr		P
H201	Bach Mai 1	M	44	Ba Vi HA TAY	HIV	nr	nr	nr		D

H202	Inst militaire	F	20	Hai Ha QUANG NINH	non HIV	non	nr	non		P
H203	Inst militaire	M	21	Gia Vian NINH BINH	HIV	nr	nr	nr		P
H204	St Paul	M	1,5	Gia Lam HANOI	?	nr	nr	nr		N
H205	St Paul	M	1	Gia Lam HANOI	?	nr	nr	nr		N
H206	St Paul	M	2	Gia Lam HANOI	?	nr	nr	nr		N
H207	St Paul	F	1,5	Dong Da HANOI	?	nr	nr	nr		P
H208	St Paul	F	7	Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		N
H209	St Paul	F	1	Hoan Kiem HANOI	?	oui	nr	oui		N
H210	St Paul	F	1,5	Hai Ba Trung HANOI	?	nr	nr	nr		N
H211	St Paul	M	2	Hai Ba Trung HANOI	?	nr	nr	nr		N
H212	St Paul	M	1,5	Ba Dinh HANOI	?	nr	nr	nr		N
H213	St Paul	M	2	Thanh Tri HANOI	?	nr	nr	nr		P

nr : non renseigné

? : statut immunitaire inconnu

: PCR temps réel positive

N : négatif

P : positif

## b) Résultats Niger

	âge	sexe	Statut Immunitaire	diarrhées	TTT ARV	CD4	IF	Weber	Ziehl
N1	32	F	VIH	non	non	97	neg	nr	neg
N2	34	M	VIH	chronique	non	271	p/p/p	neg	neg
N3	29	M	VIH	chronique	non	260	neg	nr	neg
N4	43	M	VIH	chronique	non	28	neg	nr	pos
N5	43	M	VIH	chronique	non	59	p/p/p	pos	pos
N6	36	F	VIH	chronique	non	21	p/D/p	neg	neg
N7	44	M	VIH	aigue	non	6	n/D/D	nr	neg
N8	28	M	VIH	chronique	non	92	D/D/p	pos	pos
N9	35	M	VIH	chronique	non	23	D/D/p	neg	neg
N10	50	M	VIH	chronique	oui 6mois	170	neg	nr	neg
N11	42	M	VIH	chronique	non	26	p/n/p	neg	pos
N12	34	M	VIH	chronique	oui 5mois	48	neg	nr	neg
N13	44	M	VIH	chronique	non	184	neg	nr	neg
N14	33	M	VIH	chronique	non	95	neg	nr	neg
N15	39	M	VIH	non	non	66	n/p/p	neg	neg
N16	34	M	VIH	non	non	47	neg	nr	neg
N17	37	F	VIH	aigue	non	202	neg	nr	neg
N18	39	F	VIH	chronique	non	113	neg	nr	neg
N19	40	M	VIH	non	non	200	neg	nr	neg
N20	3	F	VIH	non	non	1093	neg	nr	neg
N21	5	F	VIH	aigue	non	383	neg	nr	neg
N22			VIH	chronique			neg	nr	neg
N23	47	M	VIH	chronique	non	23	neg	nr	neg
N24	28	M	VIH	aigue	non	2	neg	nr	neg
N25	24	F	VIH	chronique	non	183	neg	nr	neg
N26	45	M	VIH	chronique	non	42	neg	nr	neg
N27	58	F	VIH	aigue	non	5	neg	nr	neg
N28	28	F	VIH	chronique	non	2	neg	nr	pos
N29	40	M	VIH	chronique	non	304	neg	nr	neg
N30	34	M	VIH	aigue	non	22	p/p/p	pos	pos
N31	27	F	VIH	non	non	33	neg	nr	neg
N32	35	M	VIH	chronique	non	173	neg	nr	pos
N33	34	M	VIH	aigue	non	224	neg	nr	neg
N34	42	M	VIH	chronique	non	63	neg	nr	pos
N35	9	F	VIH	chronique	non	23	neg	nr	neg
N36	34	M	VIH	aigue	oui 3mois	126	neg	nr	neg
N37	55	M	VIH	chronique	non	550	neg	nr	neg
N38	46	F	VIH	non	non	109	neg	nr	neg
N39	31	M	VIH	non	non	135	neg	nr	neg
N40	29	M	VIH			751	D	D	neg
N41	28	F	VIH	chronique	non	102	neg	nr	neg
N42	45	M	VIH	non	non	179	neg	nr	neg
N43	45	F	VIH	non	non	10	D	neg	neg
N44	50	M	VIH	chronique	oui 2mois	189	neg	nr	neg
N45	38	F	VIH	aigue	non	319	neg	nr	neg
	âge	sexe	Statut Immunitaire	diarrhées	TTT ARV	CD4	IF	Weber	Ziehl

N46	45	M	VIH	chronique	non	2	neg	nr	neg
N47	40	M	VIH	non	oui 6mois		neg	nr	neg
N48	32	F	VIH	non	non	16	pos	pos	pos
N49	33	M	VIH	non	non	14	neg	nr	neg
N50	55	M	VIH	chronique	non	91	neg	nr	neg
N51	27	M	VIH	non	non	664	neg	nr	neg
N52	37	M	VIH	non	oui 3mois	126	neg	nr	neg
N53	31	F	VIH	non	non	71	neg	D	neg
N54	40	M	VIH	non	non	140	neg	nr	neg
N55	38	M	VIH	chronique	oui 9mois	171	D	pos	pos
N56	45	M	VIH	chronique	non	34	neg	nr	neg
N57	35	M	VIH	non	oui 1mois	59	neg	nr	neg
N58	30	M	VIH	aigue	oui 9mois	177	neg	nr	neg
N59	45	F	VIH	non	non	525	neg	nr	neg
N60	30	F	VIH	non	non	223	neg	nr	neg
N61	20	F	VIH	chronique	non	225	neg	nr	neg
N62	45	F	VIH	non	non	62	neg	nr	neg
N63	45	M	VIH	non	oui 5mois	47	neg	nr	neg
N64	47	F	VIH	chronique	oui >12mois	2	neg	nr	neg
N65	35	F	VIH	chronique	non	391	neg	nr	neg
N66	40	M	VIH	non	non	167	neg	nr	neg
N67	30	F	VIH	non	non	339	neg	nr	neg
N68	5	F	VIH	aigue	non	48	neg	nr	neg
N69	51	F	VIH	non	non	94	neg	nr	neg
N70	18	F	VIH	non	non	394	neg	nr	neg
N71	25	F	VIH	chronique	non	3	neg	nr	neg
N72	46	M	VIH	chronique	oui 1mois	13	neg	nr	neg
N73	36	F	VIH	non	non	325	neg	nr	neg
N74	37	F	VIH	chronique	non	36	neg	nr	neg
N75	28	F	VIH	chronique	non	19	D	pos	neg
N76	36	F	VIH	aigue	oui 1mois	21	D	pos	neg
N77	30	F	VIH	non	non	275	neg	nr	neg
N78	41	M	VIH	chronique	non	304	pos	D	neg
N79	35	F	VIH	non	non	287	neg	nr	neg
N80	30	F	VIH	non	non	321	neg	nr	neg
N81	39	M	VIH	chronique	non	184	neg	nr	neg
N82	46	M	VIH	non	non	247	neg	nr	neg
N83	48	M	VIH	chronique	non	101	D	nr	pos
N84	38	M	VIH	non	oui 5mois	130	neg	nr	neg
N85	37	M	VIH	non	non	33	neg	nr	neg
N86	38	F	VIH	chronique	oui 5mois	11	neg	nr	neg
N87	33	F	VIH	chronique	non	1	neg	nr	neg
N88	57	M	VIH	non	non	111	neg	nr	neg
N89	33	M	VIH	non	non	121	neg	nr	neg
N90	25	M	VIH	chronique	non	240	D	nr	neg
N91	34	M	VIH	chronique	non	202	D	nr	neg
N92	22	F	VIH	non	non	89	neg	nr	neg
N93	35	F	VIH	non	non	491	neg	nr	neg
N94	37	M	VIH	non	non	110	neg	nr	neg
	<b>âge</b>	<b>sexe</b>	<b>Statut Immunitaire</b>	<b>diarrhées</b>	<b>TTT ARV</b>	<b>CD4</b>	<b>IF</b>	<b>Weber</b>	<b>Ziehl</b>
N95	34	M	VIH	chronique	non	157	neg	nr	neg
N96	34	M	VIH	chronique	non	16	neg	nr	neg

N97	39	M	VIH	chronique	non	7	neg	nr	neg
N98	22	F	VIH	non	non	630	D	pos	neg
N99	28	F	VIH	non	non	269	neg	nr	neg
N100	1	F	VIH	non	non	124	neg	nr	neg
N101	29	F	VIH	non	oui 1,5mois	47	neg	nr	neg
N102	50	M	VIH	non	oui ?	129	D	D	neg
N103	29	F	VIH	non	non	198	neg	nr	neg
N104	26	F	VIH	non	non	521	neg	nr	neg
N105	32	M	VIH	non	non	539	D	nr	neg
N106	30	F	VIH	non	non	818	neg	nr	neg
N107	27	F	VIH	chronique	non	479	neg	nr	neg
N108	34	F	VIH	non	non	885	neg	nr	neg
N109	40	F	VIH	non	non	264	neg	nr	neg
N110	29	F	VIH	non	non	125	neg	nr	neg
N111	32	F	VIH	aigue	non	132	D	nr	neg
N112	43	M	VIH	chronique	non	94	n/n/p	nr	neg
N113	35	M	VIH	non	non	42	neg	nr	neg
N114	42	F	VIH	chronique	non	304	neg	nr	neg
N115	43	M	VIH	aigue	non	31	n/n/p	D	neg
N116	38	M	VIH	non	non	1	neg	nr	neg
N117	43	M	VIH	chronique	non	20	neg	nr	neg
N118	52	M	VIH	non	non	19	neg	nr	neg
N119	44	M	VIH	chronique	non	65	neg	nr	neg
N120	54	M	VIH	non	non	153	n/p/n	nr	neg
N121	29	F	VIH	non	non	489	p/p/p	nr	neg
N122	25	M	VIH	chronique	non	224	neg	nr	neg
N123	34	M	VIH	non	non	495	neg	nr	neg
N124	24	F	VIH	non	oui 3mois	96	n/n/p	nr	neg
N125	38	F	VIH	non	non	476	p/p/n	pos	neg
N126	40	M	VIH	non	oui 1,5mois	41	p/p/n	pos	neg
N127	1	M	VIH	non	non	2000	neg	nr	neg
N128	26	F	VIH	non	non	616	n/p/n	nr	neg
N129	27	F	VIH	non	non	550	neg	nr	neg
N130	34	M	VIH	aigue	non	125	n/p/n	pos	neg
N131	1	M	VIH	aigue	non	244	neg	nr	neg
N132	30	F	VIH	chronique	non	202	neg	nr	neg
N133	29	F	VIH	chronique	non	166	n/D/D	nr	neg
N134	2	M	VIH	chronique	non	1080	p/D/n	nr	neg
N135	32	F	VIH	non	oui 5mois	59	p/D/n	nr	neg
N136	4	M	VIH	aigue	non	1145	n/n/p	nr	neg
N137	36	F	VIH	non	non	326	p/D/n	nr	neg
N138	25	F	VIH	chronique	non	900	D/D/n	nr	neg
N139	32	F	VIH	non	non	315	n/p/p	nr	neg
N140	27	F	VIH	non	non	886	neg	nr	neg
N141	20	F	VIH	non	non	1594	n/D/n	nr	neg
N142	26	F	VIH	non	non	190	neg	nr	neg
	<b>âge</b>	<b>sexe</b>	<b>Statut Immunitaire</b>	<b>diarrhées</b>	<b>TTT ARV</b>	<b>CD4</b>	<b>IF</b>	<b>Weber</b>	<b>Ziehl</b>
N143	33	F	VIH	chronique	non	167	neg	nr	neg
N144	25	F	VIH	non	non	51	neg	nr	neg
N145			VIH				p/D/n	nr	
N146	35	M	VIH	chronique	non	116	neg	nr	neg

N147	30	F	VIH	non	non	15	neg	nr	neg
N148	34	M	VIH	non	non	230	neg	nr	neg
N149	24	F	VIH	chronique	non	119	neg	nr	neg
N150	50	F	VIH	non	non	433	neg	nr	neg
N151	50	F	VIH	non	non	305	p/p/p	nr	neg
N152	35	F	VIH	non	non	585	D/D/p	nr	neg
N153	45	M	VIH	non	non	421	neg	nr	neg
N154	30	F	VIH	non	non	3	neg	nr	pos
N155	38	M	VIH	non	non	40	n/p/p	pos	neg
N156	27	F	VIH	non	non	690	neg	nr	neg
N157	42	F	VIH	non	non	1155	n/n/p	nr	neg
N158	42	M	VIH	non	non	233	neg	nr	neg
N159	29	M	VIH	aigue	non	358	n/p/n	nr	neg
N160	36	F	VIH	non	non	660	n/p/n	nr	neg
N161	1	M	VIH	chronique	non	904	neg	nr	pos
N162	33	M	VIH	non	non	202	D/n/p	nr	neg
N163	24	F	VIH	non	non	416	neg	nr	neg
N164	2	M	VIH	non	non	1172	neg	nr	neg
N165	32	F	VIH	aigue	non	403	n/p/n	nr	neg
N166	32	M	VIH	non	non	1690	neg	nr	neg
N167	38	M	VIH	aigue	non	192	neg	nr	neg
N168	30	F	VIH	non	non	134	neg	nr	neg
N169	32	M	VIH	non	non	147	neg	nr	neg
N170	28	M	VIH	non	non	45	neg	nr	neg
N171	38	M	VIH	chronique	non	233	n/n/p	nr	neg
N172	38	F	VIH	non	oui	127	p/p/n	nr	neg
1	53	F	VIH	nr	nr	153	pos	pos	neg
2	43	M	VIH	nr	nr	183	neg	nr	neg
3	30	M	VIH	nr	nr	80	neg	nr	neg
4	36	F	VIH	nr	nr	463	neg	nr	neg
5	30	F	VIH	nr	nr	344	neg	nr	pos
6	29	M	VIH	nr	nr	5	neg	nr	neg
7	38	M	VIH	nr	nr	178	neg	nr	pos
8	30	M	VIH	nr	nr	36	pos	pos	neg
9	40	M	VIH	nr	nr	638	neg	nr	neg
10	30	M	VIH	nr	nr	247	neg	nr	neg
11	40	F	VIH	nr	nr	173	neg	nr	neg
12	28	F	VIH	nr	nr	224	neg	nr	neg
13	29	F	VIH	nr	nr	190	pos	pos	neg
14	19	F	VIH	nr	nr	406	neg	nr	neg
15	25	F	VIH	nr	nr	134	neg	nr	neg
16	30	F	VIH	nr	nr	342	neg	nr	neg
17	26	F	VIH	nr	nr	100	pos	pos	neg
18	30	F	VIH	nr	nr	55	neg	nr	neg
19	40	M	VIH	nr	nr	10	neg	nr	neg
	<b>âge</b>	<b>sexe</b>	<b>Statut Immunitaire</b>	<b>Diarrhées</b>	<b>Ttt ARV</b>	<b>CD4</b>	<b>IF</b>	<b>Weber</b>	<b>Ziehl</b>
20	45	M	VIH	nr	nr	475	pos	pos	neg
21	26	F	VIH	nr	nr	118	neg	nr	neg
22	58	M	VIH	nr	nr	739	neg	nr	neg
23	41	F	VIH	nr	nr	287	pos	neg	neg
24	30	F	VIH	nr	nr	37	pos	pos	pos
25	41	F	VIH	nr	nr	24	neg	nr	neg

26	23	F	VIH	nr	nr	111	neg	nr	neg
27	36	M	VIH	nr	nr	260	neg	nr	neg
28	55	M	VIH	nr	nr	352	neg	nr	neg
29	44	F	VIH	nr	nr	68	neg	nr	neg
30	23	M	VIH	nr	nr	785	pos	pos	neg
31	25	F	VIH	nr	nr	173	neg	nr	neg
32	27	F	VIH	nr	nr	62	neg	nr	pos
33	22	M	VIH	nr	nr	303	neg	nr	neg
34	25	F	VIH	nr	nr	172	neg	nr	neg
35	27	F	VIH	nr	nr	370	neg	nr	neg
36	32	F	VIH	nr	nr	193	neg	nr	neg
37	53	M	VIH	nr	nr	248	neg	nr	neg
38	40	F	VIH	nr	nr	643	neg	nr	neg
39	25	F	VIH	nr	nr	299	neg	nr	neg
40	30	F	VIH	nr	nr	441	neg	nr	neg
41	46	M	VIH	nr	nr	541	neg	nr	neg
42	27	F	VIH	nr	nr	324	neg	nr	neg
43	48	M	VIH	nr	nr	754	neg	nr	neg
44	8	M	VIH	nr	nr	470	neg	nr	neg
45	34	F	VIH	nr	nr	749	pos	pos	neg
46	45	M	VIH	nr	nr	659	neg	nr	neg
47	27	F	VIH	nr	nr	123	neg	nr	neg
48	7	F	VIH	nr	nr	1	pos	pos	pos
49	35	F	VIH	nr	nr	368	neg	nr	neg
50	44	M	VIH	nr	nr	178	neg	nr	pos
51	24	F	VIH	nr	nr	431	neg	nr	neg
52	39	M	VIH	nr	nr	86	pos	pos	neg
53	32	F	VIH	nr	nr	118	neg	nr	neg
54	35	M	VIH	nr	nr	320	neg	nr	neg
55	38	F	VIH	nr	nr	264	neg	nr	neg
56	46	M	VIH	nr	nr	89	neg	nr	neg

pos/p : positif

neg/n : négatif

D : douteux

nr : non réalisé

: PCR *E. bienersi* temps réel positive

*c) Ensemble des résultats des échantillons douteux ou positifs en microscopie optique : PCR temps réel et géotypes.*



	Sexe	Age	Hôpital	Aspect	Diarrhée	Autres	Statut Itr	CD4	IF	Weber	Ziehl	PCR <i>E. b</i>	PCR <i>E. i</i>	Séquençage	Remarque
<b>H3</b>	F	26	Dong Da				?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H9</b>	F	66	Dong Da	aqueuse			?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H24</b>	F	25	français	liq orange			HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H30</b>	F	38	BM2	solide		corticothérapie	SLE 4 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H31</b>	H		Dong Da	liquide			?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H32</b>	F	45	BM2	solide		corticothérapie	SLE 8 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H35</b>	F	36	BM2	solide		corticothérapie	SLE 10 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H54</b>	H	34	I milit	chamoix			HIV	75	pos	pos	nr	pos	neg	Génotype « E »	
<b>H56</b>	H		BM1				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H58</b>	F	35	BM2			contact porc et poulet	SLE 3 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H59</b>	F	43	BM2			corticothérapie	SLE 4 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H61</b>	F	16	BM2				?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H66</b>	F	30	BM2			corticothérapie	SLE 14 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H67</b>	F	27	BM2			corticothérapie	SLE 2 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
<b>H69</b>	F	45	BM2				SLE 6 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		

H70	F	16	BM2				SLE 2 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H71	F	20	BM2				SLE 2 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H75	F	27	BM2			Trachéo+ corticothérapie	?	nr	pos	pos	nr	X	X		inhibiteur
H82	F	30	BM2			corticothérapie	?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H85	F	17	BM2			corticothérapie	SLE 2 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H86	H	30	BM1				HIV	500	pos	pos	nr	pos	neg	Génotype D	
H89	H	46	BM2				SLE	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H98	F	2	st paul				? Enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H100			st paul				? Enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H105	H	<1	st paul			allaitement	? Enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H108	H	<1	st paul			allaitement	? Enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H110	F	31	bavi				HIV?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H112	F	20	bavi	liq marron	oui		HIV?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H114	F	27	bavi	aq marron			HIV?	nr	D	D	nr	neg	pos	<i>E. intestinalis</i>	
H120	F	36	BM2			arthralgie	?	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H121	F	27	BM2			corticothérapie	SLE 3 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H122	F	21	BM2			corticothérapie	SLE 5 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
	<b>Sexe</b>	<b>Age</b>	<b>Hôpital</b>	<b>Aspect</b>	<b>Diarrhée</b>	<b>Autres</b>	<b>Statut Itr</b>	<b>CD4</b>	<b>IF</b>	<b>Weber</b>	<b>Ziehl</b>	<b>PCR <i>E. b</i></b>	<b>PCR <i>E. i</i></b>	<b>Séquençage</b>	<b>Remarque</b>
H123	F	36	BM2				SLE 2 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H124	M	62	BM2			fièvre 3 mois	?	nr	pos	pos	nr	X	X		inhibiteur
H125	F	25	BM2			corticothérapie	SLE 6 ans	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H127			st paul				?	nr	D	D	nr	X	X		inhibiteur
H130	F	23	BM1				HIV	500	pos	pos	nr	neg	neg		
H134	F	22	BM2			fièvre 1 mois	?	nr	pos	pos	nr				pas de tube
H136	M	32	bavi				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H140	M	23	BM1				HIV	400	pos	pos	nr	neg	neg		
H143	M	27	BM1				HIV	500	pos	pos	nr	neg	neg		
H148	F		BM2			corticothérapie	SLE 9 mois	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H157	F	30	bavi				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H159	F	22	bavi				HIV	nr	D	D	nr	neg	neg		
H160	F	29	bavi				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H161	F	31	bavi				HIV	nr	pos	pos	nr	conta	neg		
H165	M		I milit				?	nr	D	D	nr	neg	neg		
H166	M	32	BM1				HIV	nr	pos ++	pos	nr	pos	neg	Génotype E	
H167	M	35	BM1				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		

H168	M	49	st paul				?	nr	D	D	nr	neg	neg		
H173	F	3	st paul				enf	nr	pos++	pos	nr	pos	neg	Génotype D	
H175	F	6	st paul				enf	nr	D	D	nr	neg	neg		
H176	M	4	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H177	M	4	st paul				e nf	nr	D	D	nr	neg	neg		
H180	F	36	bavi				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H182	F	34	bavi				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H187	M	3	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H190	F	1	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H194	M	1	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H198	M	<1	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H199	M	<1	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H200	M		I milit				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H201	M	44	BM1				HIV	nr	D	D	nr	neg	neg		
H202	F	20	I milit				non HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H203	M	21	I milit				HIV	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
		Age	Hôpital	Aspect	Diarrhée	Autres	Statut Itr	CD4	IF	Weber	Ziehl	PCR E. b	PCR E. i	Séquençage	Remarque
H207	F	1	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	neg	neg		
H213	M	2	st paul				enf	nr	pos	pos	nr	pos	neg	Génotype E	
N2	M	34			chronique		HIV	271	p/p/p	neg	neg	pos	neg	Génotype A	
N5	M	43			chronique		HIV	59	p/p/p	pos	pos	pos	neg	Génotype A	
N6	F	36			chronique		HIV	21	p/D/p	neg	neg	pos	neg	Génotype K	
N7	M	44			aigue		HIV	6	n/D	nr	neg	neg	neg		
N8	M	28			chronique		HIV	23	D/D/p	pos	pos	pos	neg	Génotype « K/E »	
N9	M	35			chronique		HIV	23	D/D/p	neg	neg	pos	neg	Génotype A	
N11	M	42			chronique		HIV	26	p/n/p	neg	pos	pos	neg	Génotype D	
N15	M	39			non		HIV	66	n/p/p	neg	neg	pos	neg	Génotype A	
N30	M	34			chronique		HIV	22	p/p/p	pos	pos	pos	neg	Génotype A	
N40	M	29					HIV	751	D	pos	neg	neg	neg		
N43	F	45			non		HIV	10	D	neg	neg	pos	neg	Génotype « B »	
N48	F	32			non		HIV	16	pos	D	pos	neg	neg		
N55	M	38			chronique	ttt depuis 9mois	HIV	171	D	pos	pos	pos	neg		
N75	F	28			chronique		HIV	19	D	pos	neg	pos	neg	Génotype A	
N76	F	36			aigue	ttt depuis 1 mois	HIV	21	D	pos	neg	pos	neg	Génotype A	
N78	M	41			chronique		HIV	304	pos	D	neg	pos	neg		

N83	M	48			chronique		HIV	101	D	nr	pos	neg	neg		
N90	M	25			chronique		HIV	240	D	nr	neg	neg	neg		
N91	M	34			chronique		HIV	202	D	nr	neg	neg	neg		
N97	M	38			chronique		HIV	7	D	nr	neg	neg	neg		
N98	F	22			non		HIV	630	D	pos	neg	pos	neg	Génotype « K/E »	
N102	M	50			non		HIV	129	D	D	neg	pos	neg	pas de résultat	
N105	M	32			non		HIV	539	D	nr	neg	neg	neg		
N111	F	32			aigüe		HIV	132	D	nr	neg	neg	neg		
N112	M	43			chronique		HIV	94	n/n/p	nr	neg	neg	neg		
N115	M	43			aigüe		HIV	31	n/n/p	D	neg	pos	neg	Génotype A	
N120	M	54			non		HIV	153	n/p/n	nr	neg	neg	neg		
N121	F	29			non		HIV	489	p/p/p	nr	neg	neg	neg		
N124	F	24			non	ttt depuis 3 mois	HIV	96	n/n/p	nr	neg	neg	neg		
N125	F	38			non		HIV	476	p/p/n	pos	neg	pos	neg	pas de résultat	
N126	M	40			non	ttt depuis 1,5 mois	HIV	41	p/p/n	pos	neg	pos	neg	pas de résultat	
	Sexe	Age	Hôpital	Aspect	Diarrhée	Autres	Statut Itr	CD4	IF	Weber	Ziehl	PCR E. b	PCR E. i	Séquençage	Remarque
N128	F	26			non		HIV	616	n/p/n	nr	neg	neg	neg		
N130	M	34			aigüe		HIV	125	n/p/n	pos	neg	pos	neg	pas de résultat	
N133	F	29			chronique		HIV	166	n/D/D	nr	neg	neg	neg		
N134	M	2			chronique		HIV	1080	p/D/n	nr	neg	neg	neg		
N135	F	32			non	ttt depuis 5 mois	HIV	59	p/D/n	nr	neg	neg	neg		
N136	M	4			aigüe		HIV	1145	n/n/p	nr	neg	neg	neg		
N137	F	36			non		HIV	326	p/D/n	nr	neg	neg	neg		
N138	F	25			chronique		HIV	900	D/D/n	nr	neg	neg	neg		
N139	F	32			non		HIV	315	n/p/p	nr	pos	neg	neg		
N141	F	20			non		HIV	1594	n/D/n	nr	neg	neg	neg		
N145						? Ttt	HIV		p/D/n	nr	neg	neg	neg		
N151	F	50			non		HIV	305	P/P/P	nr	neg	neg	neg		
N152	F	35			non		HIV	585	D/D/p	nr	neg	neg	neg		
N155	M	38			non		HIV	40	n/p/p	pos	neg	pos	neg	Génotype « B »	
N157	F	42			non		HIV	1155	n/n/p	nr	neg	neg	neg		
N159	M	29			aigüe		HIV	358	n/p/n	nr	neg	neg	neg		
N160	F	36			non		HIV	660	n/p/n	nr	neg	neg	neg		
N162	M	33			non		HIV	202	D/n/p	nr	neg	neg	neg		
N165	F	32			aigüe		HIV	403	n/p/n	nr	neg	neg	neg		

N171	M	38			chronique		HIV	233	n/n/p	nr	neg	neg	neg		
N172	F	38			non		HIV	127	P/P/n	nr	neg	neg	neg		
1	F	53		molle		E. coli	HIV	153	pos	pos	neg	neg	neg		
8	M	30		molle			HIV	36	pos	pos	neg	pos	neg	Génotype A	
13	F	29		molle			HIV	190	pos	pos	neg	pos	neg	pas de résultat	
17	F	26		molle		levures	HIV	100	pos	pos	neg	neg	neg		
20	M	45		molle			HIV	475	pos	pos	neg				pas de tube
23	F	41		molle			HIV	287	pos	neg	neg	neg	neg		
24	F	30		molle			HIV	37	pos	pos	pos	pos	neg	Génotype A	
30	M	23		molle			HIV	785	pos	pos	neg	neg	neg		
45	F	34		molle			HIV	749	pos	pos	neg				QI
48	F	7		molle		bactéries +++	HIV	1	pos	pos	pos	pos	neg	Génotype « B »	
	Sexe	Age	Hôpital	Aspect	Diarrhée	Autres	Statut Itr	CD4	IF	Weber	Ziehl	PCR E. b	PCR E. i	Séquençage	Remarque
52	M	39		molle			HIV	86	pos	pos	neg	neg	neg		
DIA	M	33	CH LaRoche	liquide			HIV	<1	D	D	nr	neg	neg		
RUK	F	32	CHU Nantes	moulée			HIV		D	D	nr	neg	neg		
JOL	M	37	CHU Nantes	molle			HIV		D	D	nr	neg	neg		
LER	M	47	CHU Nantes	diarrhémique			HIV		D	D	nr	neg	neg		
MBE.	F	59	CHU Nantes	moulée			HIV	140	D	D	nr	neg	neg		
CAR		40	CHU Nantes	moulée			HIV		D	D	nr	neg	neg		
THO	M		CHU Nice				non HIV		pos		nr	pos	neg	Génotype « B »	
LAR	M	50	CHU Nice				ID non HIV		pos		nr	pos	neg	?	
VAN	M	62	CHU Nice	URINE		orchi épидidymite	HIV	2	pos	pos	nr	neg	pos		
QUE	M	41	CH Vannes				HIV							Génotype « K »	

 PCR temps réel POSITIF E. bienuesi

 PCR temps réel POSITIF E. intestinalis

 Patients séropositifs pour le VIH

 Patients atteints de lupus/sous corticoïdes

nr : non réalisé  
pos/p : positif  
neg/n : négatif  
D : douteux

## **Annexe 12 : Séquences des géotypes publiés pour *E. bienersi* (région ITS, 243 pb)**

Les différents géotypes publiés de *Enterocytozoon bienersi* (Sulaiman, Fayer *et al.* 2004) (En gras, les géotypes retrouvés chez l'homme)

<b>Géotypes</b>	<b>Hôtes</b>	<b>GenBank accession</b>	<b>Références</b>
<b>A</b>	<b>Humain</b>	<b>AF101197</b>	(Rinder, Katzwinkel-Wladarsch <i>et al.</i> 1997; Breitenmoser, Mathis <i>et al.</i> 1999)
<b>B, TypeI</b>	<b>Humain</b>	<b>AF101198, AF242475</b>	(Rinder, Katzwinkel-Wladarsch <i>et al.</i> 1997; Liguory, David <i>et al.</i> 1998)
<b>C, TypeII</b>	<b>Humain</b>	<b>AF101199, AF242476</b>	(Rinder, Katzwinkel-Wladarsch <i>et al.</i> 1997; Liguory, David <i>et al.</i> 1998; Breitenmoser, Mathis <i>et al.</i> 1999; Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>D, PigEBITS9, WL8</b>	<b>Humain, Macaque, Porc, Renard, Castor, Rat musqué</b>	<b>AF101200, AF348477, AY237216, AF023245</b>	(Chalifoux, Carville <i>et al.</i> 2000; Buckholt, Lee <i>et al.</i> 2002; Sulaiman, Bern <i>et al.</i> 2003)
<b>Q</b>	<b>Humain</b>	<b>AF267147</b>	(Rinder, Thomschke <i>et al.</i> 2000)
<b>Type III</b>	<b>Humain</b>	<b>AF242477</b>	(Liguory, David <i>et al.</i> 1998)
<b>TypeIV, K, BEB5, Peru2</b>	<b>Humain, Chat, Bovins</b>	<b>AF242478, AF267141, AY331009, AY371277</b>	(Liguory, David <i>et al.</i> 1998; Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>Type V</b>	<b>Humain</b>	<b>AF242479</b>	(Liguory, David <i>et al.</i> 1998)
<b>M</b>	bovins	AF267143	(Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>I, BEB2</b>	bovins	AF135836, AY331006	(Rinder, Thomschke <i>et al.</i> 2000)
<b>UG2145</b>	Humain	AF502396	(Tumwine, Kekitiinwa <i>et al.</i> 2002)
<b>J, BEB1</b>	Bovins, Poulet	AF135837, AY331005	(Rinder, Thomschke <i>et al.</i> 2000; Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>N</b>	bovins	AF267144	(Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>BEB3</b>	bovins	AY331007	(Sulaiman, Fayer <i>et al.</i> 2004)
<b>BEB4</b>	bovins	AY331008	(Sulaiman, Fayer <i>et al.</i> 2004)
<b>L</b>	Chat	AF267142	(Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>Ebfe1A</b>	Chat	AF118144	(Mathis, Breitenmoser <i>et al.</i> 1999)
<b>P</b>	Lama	AF267146	(Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>EbpA, F</b>	Porc, Bovins	AF076040, AF135833	(Breitenmoser, Mathis <i>et al.</i> 1999) ; (Rinder, Thomschke <i>et al.</i> 2000; Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>EbpB</b>	Porc	AF076041	(Breitenmoser, Mathis <i>et al.</i> 1999)
<b>EbpC, E, WL13, Peru4</b>	<b>Porc, Castor, Rat musqué, Raton laveur, Renard, humain</b>	<b>AF076042, AF135832, AY237221, AY371279</b>	(Breitenmoser, Mathis <i>et al.</i> 1999)
<b>EbpD</b>	Porc	AF076043	(Breitenmoser, Mathis <i>et al.</i> 1999)
<b>G</b>	Porc	AF135834	(Rinder, Thomschke <i>et al.</i> 2000)
<b>H</b>	Porc	AF135835	(Rinder, Thomschke <i>et al.</i> 2000)
<b>O</b>	Porc	AF267145	(Dengjel, Zahler <i>et al.</i> 2001)
<b>PigEBITS1</b>	Porc	AF348469	(Buckholt, Lee <i>et al.</i> 2002)

PigEBITS2	Porc	AF348470	(Buckholt, Lee et al. 2002)
PigEBITS3	Porc	AF348471	(Buckholt, Lee et al. 2002)
PigEBITS4	Porc	AF348472	(Buckholt, Lee et al. 2002)
PigEBITS5	Porc	AF348473	(Buckholt, Lee et al. 2002)
PigEBITS6	Porc	AF348474	(Buckholt, Lee et al. 2002)
PigEBITS7	Porc	AF348475	(Buckholt, Lee et al. 2002)
PigEBITS8	Porc	AF348476	(Buckholt, Lee et al. 2002)
WL1	Raton laveur	AY237209	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL2	Raton laveur	AY237210	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL3	Raton laveur	AY237211	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL4	Rat musqué	AY237212	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL5	Rat musqué	AY237213	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL6	Rat musqué	AY237214	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL7	Castor	AY237215	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL9	Castor	AY237217	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL10	Rat musqué	AY237218	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
<b>WL11, Peru5</b>	<b>Renard, humain</b>	<b>AY237219, AY371280</b>	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL12	Castor, Loutre	AY237220	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL14	Rat musqué	AY237222	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL15	Castor, Rat musqué, Raton laveur, Renard	AY237223	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL16	Rat musqué, Raton laveur	AY237224	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
WL17	Raton laveur	AY237225	(Sulaiman, Fayer et al. 2003)
<b>Peru3</b>	<b>Humain</b>	<b>AY371278</b>	(Sulaiman, Bern et al. 2003)
<b>Peru6</b>	<b>Humain</b>	<b>AY371281</b>	(Sulaiman, Bern et al. 2003)
<b>Peru7</b>	<b>Humain</b>	<b>AY371282</b>	(Sulaiman, Bern et al. 2003)
<b>Peru8</b>	<b>Humain</b>	<b>AY371283</b>	(Sulaiman, Bern et al. 2003)
<b>Peru10</b>	<b>Humain</b>	<b>AY371285</b>	(Sulaiman, Bern et al. 2003)
<b>Peru11</b>	<b>Humain</b>	<b>AY371286</b>	(Sulaiman, Bern et al. 2003)

&gt;A /Peru1

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGTGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>I/B

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCAGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGTGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>C/II

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGAAATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTTGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACATGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>D/EBITS9/WL8

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>Q

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATG  
CCGAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGAA  
TGTGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTTGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACATGATGGTTGGA  
TGGGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

> III

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGTAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACATGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>IV/BEB5/Peru2/K

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>V

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGATGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTACGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATATGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATTGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>M

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAATGAGTTGGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>I/BEB2

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGATAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TAGCTGCAGTGAGTTAGAGATGGTCCATGAGGAAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>UG2145

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGCAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>BEB1/J

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TAGCTGCAGTGAGTTAGAGATGGTCCATGAGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>N

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTAGGTGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TAGCTGCAGTGAGTTAGAGATGGTCCATGAGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>BEB3

TCAGTTTTTAGGGTGTGAGTATCGGAATGTATAGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGCGTATCTGTAAGTGTGAGGGATG  
TAGCTGCAGTGAGTTAGAGATGGTCCATGAGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>BEB4

TCAGTTTTTGGGGTGTGAGTATCGGAATGTGTAGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TAGCTGCAGTGAGTTAGAGATGGTCCATGAGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>BEB6

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>L

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGAAGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EbfelA

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTATGAGGGATG  
TGAGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>P

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGATAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EbpA/F

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG

TGGGTGCAACGAGTTGGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EbpB

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGTGGTGTGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGTAACGAGTTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EbpC/E/WL13/Peru4/WL17

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGCTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EbpD

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGCTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>G

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGCTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>H

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAACGAGTTGGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>O

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGATGAGGGATG  
TGGGTGCAACGAGTTGGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS1

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGTGGTGGTATGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAACGAGTTGGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS2

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAACGAGCTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS3

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAACGAGTTGGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGGATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS4

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGCTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS5

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTATGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAACGAGTTGGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS6

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGTGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGAA  
GGAGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS7

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGCAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>EBITS8

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGTGGTGGTTCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL1

TCAGTTTTTTCGGGTGTTGGTATCGGAATGGATAAGAAATGATGTGTATGAGGATGGAGTCATAT  
GTGAGAATAAGGTGTGTTGTTGTGTGTATGGATGATTAGTATATCTGTGAGGATGAGGGATGGT  
ATTTTGTTAAGTTATTAGAGGAAGCATGTGAAATAAGTGGATGCGTATGTGATAGTTAGATAGT  
GAATGATGTGTGTATGGGTGATGAAAATTGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL2

TCAGTTTTTTCGGGTGTTGGTATCGGAATGCATAAGAAATGATGTGTATGATGGATGGAGTCATA  
TGTGAGAATAAGGTGTGTTGTTGTGTTATGGATGATTAGTATATCTGTGAGGATGAGGGATGGT  
ATTTTGTTAAGTTATTAGAGGAAGCATGTGAAATAAGTGGATGTGTATGTGATAGTTAGATAGT  
GAATGATGTGTGTATGGGTGATGAAAATTGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL3

TCAGTTTTTTCGGGTGTTGGTATCGGAATGCATAAGAAATGATGTGTATGATGGATGGAGTCATA  
TGTGAGAATAAGGTGTGTTGTTGTGTTATGGATGATTAGTATATCTGTGAGGATGAGGGATGGT  
ATTTTGTTAAGTTATTAGAGGAAGCATGTGAAATAAGTGGATGTGTATGTGATAGTTAGATAGT  
GAATGATGTGTGTATGGGTGATGAAAATTGGAGGTTACGGTGCGAGCGG

>WL4

TCAGTTTTTAGGGTGTGGGTATCGGAATGTATTGTGAGTGATGTGTGTGTATAGGGGATGCCGA  
GGGGACCAGCGGTGTGGTGGTATGTGTAGATGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATGTG  
GCTGCAGTGAGTTAGAGGTGGTTCATGAGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATGG  
GAGAATGATGTGTGTATAGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL5

TCAGTTTTTAGGGTGTGGGTATCGGAATGTATTGTGAGTGATGTGTGTGTATAGGGGATGCCGA  
GGGGACCAGCGGTGTGGTGGTATGTGTAGATGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATGTG

GCTGCAGTGAGTTAGAGGTGGTTCCATGAGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATGG  
GAGAATGATGTGTGTATAGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL6

TCAGTTTTTAGGGTGTGGGTATCGGAATGTATTGTGAGTGATGTGTGTGTATAGAGGATGCCGA  
GGGGACCAGCGGTGTGGTGGTATGTGTAGATGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATGTG  
GCTGCAGTGAGTTAGAGGTGGTTCCATGAGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATGG  
GGGAATGATGTGTGTATAGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL7

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGGGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL9

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGTAGCGAGTTAAAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL10

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGCGAGGGTGAAGGATG  
TGGGTGTAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL11/Peru5

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGTAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL12

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGTGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL14

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGCCAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGAT  
GGGAGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAAGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL15

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGCTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGAGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAAGTTGCGGTGCGAGCGG

>WL16

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGTAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGCTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGAGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAAGTTGCGGTGCGAGCGG

>Peru3

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTATGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG

TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>Peru6

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGATGATGTGTGTGTGTATGGGAGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTAAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>Peru7

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTATGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGTAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGTAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>Peru8

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGGGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>Peru9

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>Peru10

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGGGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTAAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

>Peru11

TCAGTTTTTGGGGTGTGGGTATCGGAATGTGTGGTAGGTGATGTGTGTGTGTATGGGGGATGCC  
GAGGGGACCAGCGGTGCGGTGGTGTGTGCAGGCGTGAGAGTGTATCTGCAAGTGTGAGGGATG  
TGAGTGCAGCGAGTTAGAGGTGGTTCCATGTGGAATAGTGGGATTGGTACGTGATGGTTGGATG  
GGGGAATGATGTGTGTATGGGTGAGGAAAATCGGAGGTTGCGGTGCGAGCGG

**Annexe 13 : Alignement de la région ITS. Génotypes connus chez l'homme et séquences de notre étude**

## Zone de polymorphisme de la région ITS

Position des nucléotides	17	31	38	49	52'	52"	58	77	80	81	93	100	113	117	124	130	134	137	141	149	157	168	178	214	223		
Consensus	G	G	G	G	*	*	G	G	G	C	T	G	C	G	G	G	C	T	T	G	G	G	G	G	C	génotype	
A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
B	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
C	T	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	A	.	.	C	.	T	.	.	.	A	.	.	A
D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	D
K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	K
Q (=C 245pb)	T	A	.	.	G	T	.	.	.	T	.	.	T	.	A	.	.	C	.	T	.	.	.	A	.	.	Q
TypeIII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	A	.	.	.	TypeIII
TypeV	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	T	TypeV
Peru3	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	Peru3
E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	E
Peru5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	Peru5
Peru6	.	A	A	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	Peru6
Peru7	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	Peru7
Peru8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	Peru8
Peru10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	Peru10
Peru11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	Peru11
N2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	K
N8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	"K OU E"
N9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	D
N15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N43	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	"B"
N75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N98	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	"K OU E"
N115	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N155	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	"B"
N'8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N'24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
N'48	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	"B"
H54	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	"E"
H86	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	D
H166	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	E
H173	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	D
H213	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	E
QUE	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	"K"
THO	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	"B"



	181						243
H166	ATGGTTGGAT	GGGGGAATGA	TGTGTGTATG	GGTGAGGAAA	ATCGGAGGTT	GCGGTGCGAG	CGG
H213	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
EbpC/E/WL1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...

**Annexe 15: Alignements des séquences retrouvées au Niger par rapport aux génotypes connus**

**N2, N5, N9, N15, N30, N75, N76, N115, N'8, N'24 : Génotype A**

	1								90
A	TCAGTTTTTTG	GGGTGTGGGT	ATCGGAATGT	GTGGTAGGTG	ATGTGTGTGT	GTATGGGGGA	TGCCGAGGGG	ACCAGCGGTG	CGGTGGTGTG
N2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N30	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N75	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N76	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N115	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 24	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	91								180
A	TGTAGGCCGTG	AGAGTGTATC	TGCAAGGGTG	AGGGATGTGG	GTGCAGTGAG	TTAGAGGTGG	TTCCATGTGG	AATAGTGGGA	TTGGTACGTG
N2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N30	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N75	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N76	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N115	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 24	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	181						243
A	ATGGTTGGAT	GGGGGAATGA	TGTGTGTATG	GGTGAGGAAA	ATCGGAGGTT	GCGGTGCGAG	CGG
N2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N30	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N75	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N76	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N115	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N' 8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N' 24	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...

**N43, N155 et N'48 : une base de différence avec le Génotype B/I**

N43	TCAGTTTTTG	GGGTGTGGGT	ATCGGAATGT	GTGGTAGGTG	ATGTGTGTGT	GTATGGGGGA	TGCCGAGGGG	ACCAGCAGTG	CGGTGGTGTG
N155	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 48	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
I/B	.....	.....	.....	<b>A</b> .....	.....	.....	.....	.....	.....

	91								180
N43	TGTAGGCGTG	AGAGTGTATC	TGCAAGGGTG	AGGGATGTGG	GTGCAGTGAG	TTAGAGGTGG	TTCCATGTGG	AATAGTGGGA	TTGGTACGTG
N155	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 48	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
I/B	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	181						243
N43	ATGGTTGGAT	GGGGGAATGA	TGTGTGTATG	GGTGAGGAAA	ATCGGAGGTT	GCGGTGCGAG	CGG
N155	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N' 48	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
I/B	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...

**N8 et N98 : IV/K ou E**

	1								90
N8	TCAGTTTTTG	GGGTGTGGGT	ATCGGAATGT	GTGGTAGGTG	ATGTGTGTGT	GTATGGGGGA	TGCCGAGGGG	ACCAGCGGTG	CGGTGGTGTG
N98	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IV/BEB5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
EbpC/E/WL1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	91								180
N8	TGTAGGCGTG	AGAGTGTATC	TGTAAGGGTG	AGGGATGTGG	GTGCAGCGAG	TTAGAGGTGG	TTCCATGTGG	AATAGTGGGA	TTGGTACGTG
N98	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IV/BEB5	.....	.....	..C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
EbpC/E/WL1	.....	.....	.....	.....	.....	C.....	.....	.....	.....
	181								243
N8	ATGGTTGGAT	GGGGGAATGA	TGTGTGTATG	GGTGAGGAAA	ATCGGAGGTT	GCGGTGCGAG	CGG		
N98	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IV/BEB5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
EbpC/E/WL1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**N6 : Génotype IV/K/BEB5/Peru2**

	1								90
N6	TCAGTTTTTG	GGGTGTGGGT	ATCGGAATGT	GTGGTAGGTG	ATGTGTGTGT	GTATGGGGGA	TGCCGAGGGG	ACCAGCGGTG	CGGTGGTGTG
IV/K/BEB5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	91								180
N6	TGTAGGCGTG	AGAGTGTATC	TGCAAGGGTG	AGGGATGTGG	GTGCAGCGAG	TTAGAGGTGG	TTCCATGTGG	AATAGTGGGA	TTGGTACGTG
IV/K/BEB5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	181								243
N6	ATGGTTGGAT	GGGGGAATGA	TGTGTGTATG	GGTGAGGAAA	ATCGGAGGTT	GCGGTGCGAG	CGG		

IV/K/BEB5 .....

**N11 Génotype D/EBITS9/WL8**

	1								90
D/EBITS9	TCAGTTTTTG	GGGTGTGGGT	ATCGGAATGT	GTGGTAGGTG	ATGTGTGTGT	GTATGGGGGA	TGCCGAGGGG	ACCAGCGGTG	CGGTGGTGTG
N11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	91								180
D/EBITS9	TGCAGGCGTG	AGAGTGTATC	TGCAAGTGTG	AGGGATGTGG	GTGCAGCGAG	TTAGAGGTGG	TTCCATGTGG	AATAGTGGGA	TTGGTACGTG
N11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	181								243
D/EBITS9	ATGGTTGGAT	GGGGGAATGA	TGTGTGTATG	GGTGAGGAAA	ATCGGAGGTT	GCGGTGCCGAG	CGG		
N11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Annexe 16 : Aligement des séquences retrouvées en France par rapport aux génotypes connus**

```

1
THO TCAGTTTTTG GGGTGTGGGT ATCGGAATGT GTGGTAGGTG ATGTGTGTGT GTATGGGGGA TGCCGAGGGG ACCAGCAGTG CGGTGGTGTG 90
B ..... A.....

91
THO TGTAGGCGTG AGAGTGTATC TGCAAGGGTG AGGGATGTGG GTGCAGTGAG TTAGAGGTGG TTCCATGTGG AATAGTGGGA TTGGTACGTG 180
B .....

181
THO ATGGTTGGAT GGGGGAATGA TGTGTGTATG GGTGAGGAAA ATCGGAGGTT GCGGTGCCGAG CGG 243
B .....

1
QUE TCAGTTTTTG GGGTGTGGGT ATCGGAATGT GTGGTAGGTG ATGTGTGTGT GTATGGGGGA TGCCGAGGGG ACCAGCGGTG CGGTGGTGTG 90
K .....

91
QUE TGTAGGCGTG AGAGTGTATC TGCAAGGGTG AGGGATGTGG ATGCAGCGAG TTAGAGGTGG TTCCATGTGG AATAGTGTGA TTGGTACGTG 180
K ..... G.....G..

181
QUE ATGGTTGGAT GGGGGAATGA TGTGTGTATG GGTGAGGAAA ATCGGAGGTT GCGGTGCCGAG CGG 243
K .....

```

**Annexe 17 : Alignement de tous les séquences retrouvés au Vietnam, Niger et France**

	1		21		41				90
N2	TCAGTTTTTG	GGGTGTGGGT	ATCGGAATGT	GTGGTAGGTG	ATGTGTGTGT	GTATGGGGGA	TGCCGAGGGG	ACCAGCGGTG	CGGTGGTGTG
N5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N30	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N43	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....
N75	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N76	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N98	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N115	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N155	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....
N' 8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 24	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 48	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
H86	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
H166	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
H173	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
H213	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>LAMOC</b>	..... <b>A</b> .....	..... <b>G</b> ..... <b>A</b> .....	.....	..... <b>A.C.G.G</b> .....	..... <b>C</b> .....	..... <b>G.A</b> ..... <b>-T</b> .....	..... <b>TA</b> ..... <b>A</b> .....	..... <b>AG</b> ..... <b>A.C</b> .....	..... <b>T.A.C</b> .....
QUE	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Thomas	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....

	91								180
N2	TGTAGGCGTG	AGAGTGTATC	TGCAAGGGTG	AGGGATGTGG	GTGCAGTGAG	TTAGAGGTGG	TTCCATGTGG	AATAGTGGGA	TTGGTACGTG
N5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N6	.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
N8	.....	.....	.....T.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
N9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N11	..C.....	.....	.....T.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
N15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N30	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N43	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N75	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N76	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N98	.....	.....	.....T.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
N115	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N155	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 24	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N' 48	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
H54	.....	.....	.....T...A.....	.....	.....C.....	C.....	.....	.....	.....
H86	..C.....	.....	.....T.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
H166	.....	.....	.....T.....	.....	.....C.....	C.....	.....	.....	.....
H173	..C.....	.....	.....T.....	.....	.....C.....	.....	.....	.....	.....
H213	.....	.....	.....T.....	.....	.....C.....	C.....	.....	.....	.....
<b>LAMOC</b>	..... <b>AT</b> .....	.....	..... <b>C.T...C</b> .....	<b>G</b> .....	..... <b>CCAT</b> .....	.....	..... <b>A</b> .....	..... <b>G</b> .....	..... <b>C...G</b> .....
QUE	.....	.....	.....	.....	A.....C.....	.....	.....	.....	.....T.....
Thomas	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	181						243
N2	ATGGTTGGAT	GGGGGAATGA	TGTGTGTATG	GGTGAGGAAA	ATCGGAGGTT	GCGGTGCGAG	CGG
N5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N30	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N43	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N75	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N76	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N98	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N115	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N155	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N' 8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N' 24	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
N' 48	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
H54	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
H86	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
H166	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
H173	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
H213	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
<b>LAMOC</b>	... <b>G</b> ...	...-...	.....	.....	.....	.....	...
QUE	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...
Thomas	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...

## Annexe 18 : Résumé des différentes études réalisées en Afrique et en Asie du Sud-Est

### Prévalence des microsporidioses intestinales dans deux géographiques

	Pays	année	Prévalence	Méthode	Statut immunitaire	Génotypes de E. b	Références
<b>Afrique</b>	Niger	1993	7%	MO	VIH		(Bretagne, Foulet <i>et al.</i> 1993)
	Zimbabwe	1995	13%	MO	VIH/nonVIH		(van Gool, Luderhoff <i>et al.</i> 1995)
	Mali	1997	32%	MO	VIH/nonVIH		(Maiga, Doumbo <i>et al.</i> 1997)
	Zambie	1997	34%	MO	VIH		(Kelly, Davies <i>et al.</i> 1997)
	Cameroun	1997	9%	MO	VIH		(Same-Ekobo, Lohoue <i>et al.</i> 1997)
	Zimbabwe	1997	50%/24%	PCR/MO	VIH		(Carville, Mansfield <i>et al.</i> 1997)
	Tanzanie	1999	3%	MO/MET	VIH		(Cegielski, Ortega <i>et al.</i> 1999)
	Zimbabwe	1999	18%	MO/PCR	VIH		(Gumbo, Sarbah <i>et al.</i> 1999; Gumbo, Gangaidzo <i>et al.</i> 2000)
	Tunisie	2000	3%	MO?	VIH		(Makni, Cheikrouhou <i>et al.</i> 2000)
	Guinée-Bissau	2001	11%	MO	VIH2		(Lebbad, Norrgren <i>et al.</i> 2001)
	Mali	2002	13%	IFAT/PCR	VIH		(Alfa Cisse, Ouattara <i>et al.</i> 2002)
	Uganda	2002	17%	PCR	Enfants	K (6/10)	(Tumwine, Kekitiinwa <i>et al.</i> 2002)
	Uganda	2005	33%	?	Enfants VIH		(Tumwine, Kekitiinwa <i>et al.</i> 2005)
	Ethiopie	2005	8%	MO/PCR	VIH/nonVIH		(Endeshaw, Kebede <i>et al.</i> 2005)
	Gabon	2005	3%	IF Acme/PCR	HIV	K,D,E et Gabon 1-5	(Breton, Kombila <i>et al.</i> 2004)
	Cameroun	2006	5%	PCR	VIH	IV/K (4/8)	(Sarfaty, Bourgeois <i>et al.</i> 2006)
	<b>Niger</b>	<b>2006</b>	<b>9,8%</b>	<b>MO/PCR</b>	<b>VIH</b>	<b>A(10/19), D, « B », « K »</b>	<b>notre étude</b>
<b>AsieSud-Est</b>	Thaïlande	1998	33%	MO/MET	VIH	nr	(Wanachiwanawin, Manatsathit <i>et al.</i> 1998)
	Thaïlande	1999	4%		VIH	nr	(Wanke, Cohan <i>et al.</i> 1999)
	Thaïlande	2001	11%	MO/MET	VIH	nr	(Waywa, Kongkriengdaj <i>et al.</i> 2001)
	Inde	2002	2,5%		VIH	nr	Moh;;
	Inde (Madras)	2002	0,7%	MO	VIH	nr	(Kumar, Ananthan <i>et al.</i> 2005)
	Thaïlande	2002	25%/15%	MO	Enfants : VIH/non VIH	nr	(Wanachiwanawin, Choekphaibulkit <i>et al.</i> 2002)
	Thaïlande	2005	4%	MO/MET	enfants	A (10/10)	(Leelayoova, Subrungruang <i>et al.</i> 2005)

---

Inde	2005	6,5%	MO/PCR	VIH	nr	(Kumar, Ananthan <i>et al.</i> 2005)
<b>Vietnam</b>	<b>2006</b>	<b>2,8%</b>	<b>MO/PCR</b>	<b>VIH/nonVIH</b>	<b>D/E</b>	<b>notre étude</b>

**Annexe 19 : Publications et communications**

**Mise en évidence du premier cas de microsporidiose intestinale à  
Enterocytozoon bienewisi chez un patient VIH positif à Hanoi,  
VIETNAM**

Publié dans Médecine et Maladies Infectieuses (2005), 35 (425-426)

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Médecine et maladies infectieuses 35 (2005) 425–426

**Médecine et  
maladies infectieuses**
<http://france.elsevier.com/direct/MEDMAL/>

## Lettre à la rédaction

**Mise en évidence du premier cas de microsporidiose intestinale à *Enterocytozoon bienewisi* chez un patient VIH positif à Hanoï, Vietnam**

**Presentation of the first *Enterocytozoon bienewisi* intestinal microsporidia case in an HIV patient, Hanoi, Vietnam**

*Mots clés* : Microsporidiose ; VIH

*Keywords* : Microsporidia; HIV

### 1. Introduction

Depuis octobre 2004, une étude épidémiologique concernant les microsporidioses intestinales a été mise en place à l'institut d'hygiène et d'épidémiologie à Hanoï, Vietnam. Les microsporidies sont des organismes unicellulaires et intracellulaires dont la position taxonomique a été revue. Ils appartiennent désormais au règne des Fongis [1]. Parasites opportunistes, leur pouvoir pathogène s'exprime sous la forme de diarrhées chroniques chez les sujets immunodéprimés, et notamment chez les sujets séropositifs au VIH.

### 2. But de l'étude

Devant l'absence de données épidémiologiques concernant les microsporidies en Asie (excepté en Thaïlande [2]), cette étude pourra nous permettre d'évaluer la prévalence des infections à microsporidies dans les différentes catégories socioéconomiques de Hanoï.

### 3. Matériel et méthodes

Une étude a été mise en place à partir du mois de novembre 2004, pour dix mois, auprès des différents hôpitaux, centres de soins ou dispensaires de Hanoï. Nous avons recueilli des selles fraîches de patients diarrhéiques d'âges, de conditions sociales et de statuts immunitaires différents, dont certains au stade sida déclaré. Dix prélèvements sont reçus en moyenne par semaine, dans le cadre de cette étude.

À l'heure actuelle, cette étude porte sur 72 échantillons de selles, provenant de patients VIH connus, hospitalisés dans les différents hôpitaux de Hanoï, présentant une diarrhée non

étiquetée, plus quelques selles de patients hospitalisés avec un statut VIH non déterminé. Il n'y a eu aucun critère d'exclusion, parmi cette population.

Dans un premier temps, un dépistage microscopique a été réalisé au laboratoire de l'institut d'hygiène et d'épidémiologie de Hanoï par deux techniques complémentaires de coloration. La première est la technique de van Gool, à base d'agent immunofluorescent (Uvitex 2B<sup>®</sup>) [3], la seconde, technique de Weber, utilise une solution de trichrome modifiée [4]. Toutes deux sont adaptées, et classiquement utilisées pour le dépistage des spores de microsporidies, en revanche, le diagnostic d'espèce est impossible. Le recours à des techniques moléculaires reste indispensable et tous les échantillons suspects en microscopie optique ont été analysés en biologie moléculaire. Cette dernière étape a été réalisée au laboratoire de parasitologie du centre hospitalo-universitaire de Nantes selon une technique d'amplification génique en temps réel après extraction des échantillons selon la technique QIAmp<sup>®</sup> *rDNA Stool Mini Kit Handbook*. La réaction d'amplification est réalisée à l'aide de deux primers, Eb1 : 5'-CGA CAG CCT GTG TGT GAG AAT AC-3' et Eb5 : 5'-CAA CGA ATG ACT TGA CCC TGG TAA-3' et d'une sonde Taqman<sup>®</sup> EBS2 : 5' FAM TGC TGC TTA ATT TAA CTC AAC GCG AAA 3' TAMRA. Ces primers et sonde permettent d'amplifier un fragment de 180 pb de la petite sous-unité de l'ARNr d'*Enterocytozoon bienewisi*. Le suivi de la réaction se fait par PCR temps réel à l'aide d'un RotorGene CORBETT<sup>®</sup>.

### 4. Résultats

À ce jour, sur 72 échantillons de selles analysés à l'institut de Hanoï, 17 sont positifs ou douteux en microscopie optique. Ces selles sont envoyées au laboratoire de parasitologie de Nantes pour une analyse moléculaire. Parmi ces cas douteux ou positifs, les résultats de la PCR en temps réel ont pu confirmer le 1<sup>er</sup> cas de microsporidies à *E. bienewisi*. Il s'agit d'un homme de 34 ans VIH positif au stade sida déclaré, habitant en zone rurale et présentant une diarrhée chronique inexpliquée depuis plus d'un mois. Le jour du prélèvement son taux de CD4 était de 75/mm<sup>3</sup>.

### 5. Conclusion

Cette étude nous permet de mettre en évidence une infection à microsporidies et plus précisément *E. bienewisi* chez un

sujet VIH au Vietnam. Ces premiers résultats nous permettent donc de continuer notre étude épidémiologique concernant l'infection par *E. bienewisi*, sur dix mois à l'institut d'hygiène et d'épidémiologie à Hanoï en collaboration avec le laboratoire de parasitologie de l'hôpital de Nantes. Les résultats de cette étude seront publiés ultérieurement.

#### Remerciements

Nous tenons à remercier l'ARSIID (Association pour la recherche sur le sida et les infections chez les immunodéprimés) pour l'aide apportée au financement de notre étude.

#### Références

- [1] Keeling PJ, Luker MA, Palmer JD. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol* 2000;17(1):23–31.
- [2] Wanachawanawin D, Manatsathit S, Lertlaitun P, Thakemgpol K, Suwanagool P. Intestinal microsporidiosis in HIV infected patients with chronic diarrhea in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998;29(4):767–71.
- [3] van Gool T, Snijders F, Reiss P, Eeffinck Schattenkerk JK, van den Bergh Weerman MA, Bartelmsman JF, et al. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidia infections in patient with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol* 1993;46(8):694–9.
- [4] Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Garelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The enteric Opportunistic Infections Working Group. *N Engl J Med* 1992;326(3):161–6.

A. Lejeune \*

Adresse e-mail : anelejeune56@yahoo.fr (A. Lejeune).

A. Espern

Laboratoire de parasitologie, institut de biologie,  
CHU de Nantes, 9, quai Moncoussu,  
44093 Nantes cedex 01, France

D.C. Phung

Institut d'hygiène et d'épidémiologie de Hanoï,  
1, rue Yersin, Hai-Ba-Trung, Hanoï, Vietnam

T.C. Nguyen

Institut militaire de médecine préventive de Hanoï,  
1, rue Trung-Liet, Dong-Da, Hanoï, Vietnam

M. Miegéville

Laboratoire de parasitologie, institut de biologie,  
CHU de Nantes, 9, quai Moncoussu,  
44093 Nantes cedex 01, France

Adresse e-mail :

michel.miegéville@chu-nantes.fr (M. Miegéville).

Reçu le 18 janvier 2005 ; accepté le 22 juin 2005

Disponible sur internet le 31 août 2005

\* Auteur correspondant.

**Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bieneusi*, isolated  
from HIV-infected patients in Hanoi, Vietnam.**

XVIth Internal Congress for Tropical Medicine and Malaria.

Congrès du PHARO. Septembre 2005. Marseille.

# Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bienewsi*, isolated from HIV-Infected patients in Hanoi, Vietnam

Espem Anne<sup>1</sup>, Lejeune Anne<sup>1</sup>, Phung Dac Cam<sup>2</sup>, Miegville Michel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Parasitology and Mycology, Nantes University Hospital (France), <sup>2</sup>National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE, Hanoi (VietNam)

## INTRODUCTION

Microsporidia are obligate intracellular parasites belonging to the phylum Microspora. Recent molecular phylogenetic studies suggests that these organism are related to fungi<sup>(1)</sup>. Intestinal microsporidiosis, known as an opportunistic infection responsible for chronic diarrhoea in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is mainly caused by two species of microsporidia : *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis*. Infections by *E. bienewsi* in HIV-negative patients remains rarely reported<sup>(2)</sup> but to date, *E. bienewsi* is still the most common species involved in human infections. Prevalence of microsporidiosis in human range from 2% to 52%<sup>(3)</sup> depending of the country, the population studied and diagnosis methods. In Hanoi, Vietnam, no data have been reported about its frequency. Therefore, a study was undertaken to determine the frequency of intestinal microsporidiosis in HIV patients, by means of staining methods and real-time PCR.

## MATERIALS

From november 2004 to february 2005, thanks to the collaboration of NIHE (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, VietNam), a total of 120 fecal samples were collected from patients admitted in differents hospitals or medical centers of Hanoi district:

- ✦ Dong Da: 10 samples
- ✦ Bach Mai 1: 7 samples
- ✦ Bach Mai 2: 40 samples
- ✦ BaVi (HIV center): 5 samples
- ✦ Saint Paul (Children Hospital): 51 samples
- ✦ Hanoi French Hospital: 6 samples
- ✦ Military Institute: 1 sample

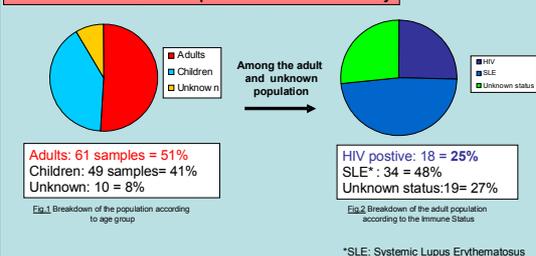
All specimens collected provided from patients whose age ranged from 1 to 75 years old.

## METHODS

- > All samples were examined microscopically for microsporidian spores, in Hanoi, using two staining methods : Uvitex 2B<sup>®</sup>(4) and the modified trichrome Weber<sup>(5)</sup>.
- > All positive or doubtful samples by microscopy were processed, in Nantes, for *E. bienewsi* species-specific real-time PCR which consist in :
  - ✦ DNA extraction according to a silica-based method (QIAmp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit, QIAGEN)
  - ✦ Amplification on a Rotor-Gene 3000<sup>®</sup> (Corbett Research) using two primer targeting a 180 bp of a highly conserved region of *E. bienewsi* ssurRNA :
    - EB1 5'-CGACAGCCTGTGTGTGAGAAATAC-3'
    - EB5 5'-CAACGAATGACTTACCCTGGTAA-3'
  - ✦ Detection ensured thanks to a specific Taqman probe
    - EB2 5'-FAM GCTGCTTAATTAACTCAACGCGGGAAAA TAMRA-3'
- > Each samples was tested in duplicate
- > Positive, negative and Internal Control (ABSystem<sup>®</sup>) were included into each run

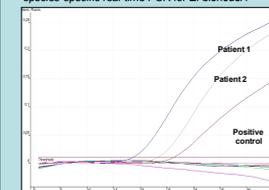
## RESULTS

### Characteristics of 120 stool specimens tested in this study

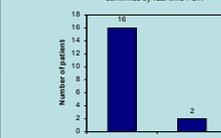
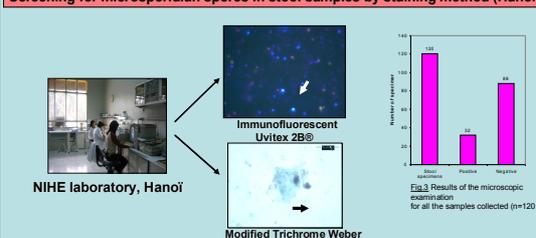


### Molecular identification of *E. bienewsi* (Nantes)

Among the positive and doubtful staining samples: species-specific real-time PCR for *E. bienewsi*



### Screening for microsporidian spores in stool samples by staining method (Hanoi)



Sample	Total	Positive samples by real-time PCR	Positive samples by staining	Adults	HIV positive
	120	2	32	61	18

Fig.6 Prevalence of *E. bienewsi* among the population

	Hospital	Sex	Age	Immune Status	CD4/mm <sup>3</sup>	Uvitex 2B <sup>®</sup>	Weber	real-time PCR <i>E. bienewsi</i>
Patient 1	Military Institute	male	34	HIV +	75	positive	positive	positive
Patient 2	Bach Mai 1	male	30	HIV +	500	positive	positive	positive

## CONCLUSION

✦ Among the 120 fecal samples collected, 2 of them, were positive by both staining methods and real-time PCR for *E. bienewsi*. This is the first report<sup>(6)</sup> of human microsporidiosis due to *E. bienewsi* in Vietnam. However the study could have been distorted: we do not have enough stool samples and we could not have a right prevalence of HIV-infected because most of the patient included in this study do not know their virologic status.

✦ Furthermore, we did not find any *E. bienewsi* in children<sup>(7)</sup>. We can imagine that this may be due to the fact that each study may concern different social stratum.

✦ Our data revealed a greater number of positive samples by microscopic analysis compare to PCR analysis targeting *E. bienewsi*. It is well-known that the traditional microscopic methods used for microsporidia detection in stools are effective as screening test, but did not allow an identification to the species level. **Species-specific PCR is an efficient tool for the identification of microsporidia in fecal samples.**

✦ Because *E. intestinalis* is frequently isolated from patient with corticotherapy or immunodepressed (48% of our the patients included our study are SLE), we can suggest that positive samples by staining but negative by PCR can be infected by non *E. bienewsi* like *E. intestinalis*. This observation lead us to improve a real-time PCR assay for detection of *E. intestinalis* which was positive for at least one sample and represente **the first isolate of *E. intestinalis* in Vietnam.**

(1) Keeling PJ, Loker BA, Palmer JD. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. Mol Biol Evol 2000; 17(1): 23-31.  
 (2) Bryan RT, Weber R, Schwartz DA. Microsporidiosis in patients who are not infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1997; 17:534-535.  
 (3) Koller DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals for gastrointestinal evaluation. Am J Gastroenterol 1994; 89: 1998.  
 (4) van Gool W, Snijders FJ, Rees PJ, Estroff SM, Schellens JHC, van den Bergh Weerman MA, Balesar AA, Baars JJ, Canning EU, Dankert J. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidia infections in patient with HIV by a new rapid fluorescence technique. J Clin Pathol 1993;46(8): 694-6.  
 (5) Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorekin L, Viveiros GS. Improved light-microscopical detection of microsporidian spores in stool and duodenal aspirates. The enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J ed 1992; 326(3):141-4.  
 (6) Espem A, Phung Dac Cam, Nguyen Trung Chien, Miegville M. Presentation of the first Enterocytozoon bienewsi intestinal microsporidia case in HIV patient, Hanoi VIETNAM. Medecine et Maladie Infectieuse. 2005  
 (7) Savarese Leddyova and al. Transmission of Enterocytozoon bienewsi genotype A in a Thai Orphanage. Am J Med Hyg. 2005; 73(1): 104-107.

**Acknowledgments:** This work was supported by ARSIID (Association pour la recherche sur le

**Etude épidémiologique des microsporidioses intestinales, isolées  
de patients séropositifs pour le VIH, dans deux zones  
géographiquement distinctes  
(Niamey, Niger et Hanoï, Vietnam)**

25e Réunion interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI).

Décembre 2005. Paris

# Etude épidémiologique des microsporidioses intestinales, dans deux zones géographiquement distinctes (Niamey, Niger et Hanoi, Vietnam)



Espérin A<sup>1</sup>, Gay-Andrieu F<sup>1,2</sup>, Lejeune A<sup>1,3</sup>, Hachimou I<sup>2</sup>, Abdoulaye M<sup>2</sup>, Pizarro V<sup>2</sup>, Adehossi E<sup>2</sup>, Cam PD<sup>3</sup>, Miegeville M<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU Nantes, France; <sup>2</sup>Hôpital National de Niamey, Niger; <sup>3</sup>Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie, Hanoi, VietNam.

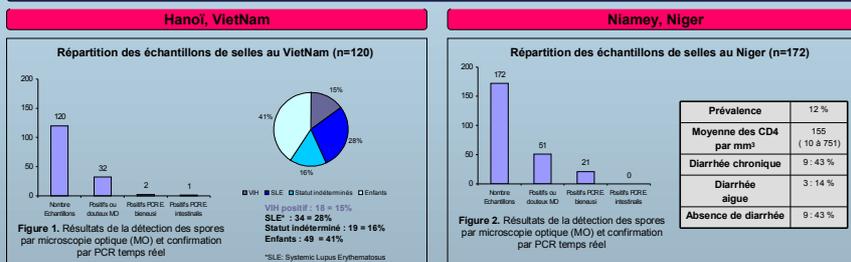
## INTRODUCTION

Les microsporidioses intestinales dues à *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* sont des infections opportunistes rencontrées chez les patients immunodéprimés, en particulier séropositifs pour le VIH. Avec l'arrivée de la trithérapie, cette affection est devenue rare en France. Ailleurs, la prévalence peut varier entre 2% et 50% en fonction des zones géographiques, de la population et des méthodes utilisées<sup>(1)</sup>. De plus, dans de nombreux pays en voie de développement, l'épidémiologie des microsporidies reste encore très peu documentée. Le but de cette étude était de comparer les résultats obtenus dans deux régions du monde : Afrique Sub-Saharienne et Asie du Sud-est. Ce travail a été réalisé en parallèle au VietNam et au Niger, pays différents par leurs populations, coutumes et géographie.

## MATERIELS et METHODES

✦Echantillons : Entre novembre 2004 et février 2005, 292 échantillons de selles ont été recueillis : 120 au VietNam, dont 18 de patients VIH et 172 au Niger, tous VIH. Le dépistage des patients porteurs de microsporidies a été réalisé, sur le terrain à Niamey et à Hanoi. La confirmation par biologie moléculaire a été réalisée à Nantes.  
 ✦Dépistage : par microscopie optique, deux techniques de colorations ont été réalisées : trichrome de Weber et Van Gool.  
 ✦PCR temps réel :  
 - Extraction de l'ADN par le coffret : QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit, QIAGEN  
 - Une détection par PCR en temps réel a été réalisée sur un appareil Rotor-gene (CorbettResearch®), à la fois pour *E. bienewisi* et *E. intestinalis* <sup>(2)</sup>  
 - Chaque échantillon a été testé en double, avec un contrôle interne (IPC Exogenus®)  
 ✦Un séquençage<sup>(3)</sup> a été réalisé sur les souches positives à *E. bienewisi*. Les séquences ont été analysées à l'aide de Blast analysis et BIBI, comparées dans GenBank. <sup>(4)</sup>

## RESULTATS

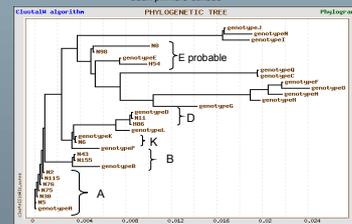


## Analyse des séquences et détermination des génotypes

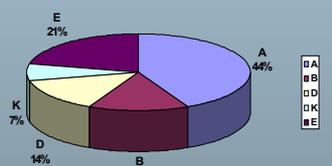
La caractérisation du génotype d'*E. bienewisi* a été déterminée grâce au site de polymorphisme ITS de l'ARNr des microsporidies.



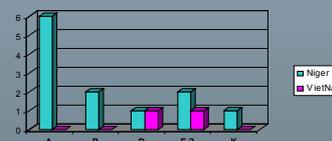
**Figure 3.** Représentation des fragments du génome d'une microsporidie et son amplification en vue du séquençage, amplification de 508pb dont 203pb de la région ITS (Internal Transcribed Spacer). MSP3 et MSP4B, sont les deux primers utilisés



**Figure 4.** Arbre phylogénétique des séquences ITS analysées



**Figure 5.** Répartition des différents génotypes analysés



**Figure 6.** Répartition des génotypes en fonction de leur origine géographique.

## CONCLUSION

- ✓ La prévalence retrouvée au Niger, 12%, est proche de celle retrouvée en France avant l'arrivée de la trithérapie. Elle est plus élevée que la prévalence retrouvée dans l'étude de Bretagne *et al.* en 1993.<sup>(1)</sup>
- ✓ Seul *E. bienewisi* a été retrouvé au Niger, alors que les deux espèces : *E. bienewisi* et *E. intestinalis* ont été retrouvés au VietNam.
- ✓ On notera une prédominance des génotype A et B, génotypes humain, au Niger. C'est sont les génotypes les plus souvent retrouvés dans les différentes études.
- ✓ Le génotype E n'a pu être confirmé. Nous avons observé une discordance dans les deux bases de données consultées (Blast et BIBI). Un nouveau séquençage sera envisagé.
- ✓ On ne peut exclure une origine animale pour les autres génotypes (D : humain, macaque et porc, E : porc, K : chat).
- ✓ L'analyse des séquences de la région ITS de l'ARNr montre une variation des génotypes au sein d'une même population. Cependant, au Niger, avec la prédominance du génotype A, une contamination interhumaine est probable.
- ✓ La difficulté d'obtention de selles de patients HIV, au VietNam, réduit l'intérêt d'une partie de ce travail. Mais cette étude montre pour la première fois l'existence des microsporidies au VietNam et des travaux, sur un plus grand nombre d'échantillons, seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

(1) Kober CP, Choudhry M. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals for gastro-intestinal evaluation. Am J Gastroenterol 1994; 89: 1899  
 (2) Menz B, et al. Development of a Real Time PCR Assay for Quantitative Detection of *E. intestinalis* DNA. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41 (1410-1413)  
 (3) Saito F, et al. Cloning of *Enterocytozoon bienewisi* in AIDS Patients from Niamey (West of Congo). Journal of Medical Microbiology 2002; 44: 404-407  
 (4) Dengel B, et al. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bienewisi*. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39 (4665-4669)  
 (5) Meebol A, et al. Zoonotic potential of the Microsporidia. Clinical Microbiology Reviews 2005; 18 (423-440)

**Remerciements:**  
 = ARSIID: Association de Recherche sur le SIDA et les Infections chez les Immunodéprimés, pour l'aide apporté au financement de cette étude.  
 = LD BIO Diagnostics, pour avoir fourni gracieusement, les réactifs UVIBIO pour l'étude de Niamey.

**Prévalence des microsporidioses intestinales chez les patients  
séropositifs pour le VIH, à la mise en place de l'INAARV  
(Initiative Nigérienne pour l'Accès aux Anti-Rétroviraux)  
Niamey, Niger.**

Congrès International de Parasitologie de Dakar et  
44<sup>e</sup> colloque du groupement des protistologues de langue française  
Dakar-Sénégal 22-26 mai 2006  
(Communication orale)

***Références Bibliographiques***



UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE PHARMACIE

Année de la Soutenance  
2006

---

Nom – Prénom : ESPERN Anne

Titre de la Thèse : Prévalences et études génotypiques des microsporidioses intestinales dans trois zones géographiques distinctes (Vietnam, Niger, et France).

---

**Résumé de la Thèse** : Les microsporidioses intestinales dues à *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* sont des infections opportunistes chez les patients VIH. Le but de cette étude était de préciser l'épidémiologie des microsporidies dans trois pays différents sur le plan géographique, socio-économique, et culturel.

De novembre 2005 à août 2006, 228 échantillons de selles ont été récoltés à Niamey (Niger), 213 à Hanoï (Vietnam) et 183 à Nantes (France).

Le dépistage des microsporidies a été effectué sur le terrain grâce à deux techniques de coloration. Le diagnostic a ensuite été confirmé par biologie moléculaire à Nantes pour la recherche spécifique de *E. bieneusi* et *E. intestinalis*. Les échantillons positifs à *E. bieneusi* ont fait l'objet d'un génotypage.

Les prévalences parmi les patients séropositifs pour le VIH sont celles retrouvées, notamment en France avant l'arrivée de la multithérapie : respectivement 9,3 et 10,5% au Vietnam et au Niger. La prévalence en France est devenue très faible (2%).

Le séquençage nous a permis la mise en évidence de génotypes différents entre Niamey et Hanoï, préjugant d'une éventuelle contamination interhumaine (Niger) ou zoonotique (Vietnam).

---

Mots Clés : *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, VIH, prévalence, génotypes, Vietnam, Niger

---

JURY	PRESIDENT :	Madame le Professeur B.M. IMBERT
	ASSESEURS :	Monsieur le Docteur M. MIEGEVILLE
		Monsieur le Professeur F. RAFFI
		Madame le Docteur F. GAY-ANDRIEU

---

Adresse de l'auteur : 19 rue Stephenson – 44000 Nantes