

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2006

N°9

THESE

Pour le

DIPLÔME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

LEJEUNE Anne

Présentée et soutenue publiquement le 10 Mars 2006

**RECHERCHE DE MICROSPORIDIOSES
INTESTINALES HUMAINES À HANOI, VIETNAM**

Président : Mr Alain Pineau, professeur de toxicologie

Directeur de thèse : Mr Michel Miegville, maître de conférence de parasitologie

Membres du Jury : Mr Yves-François Pouchus, professeur de Botanique et de Mycologie ; Mme Anne Marie Cantereau et Mme Cécile Amiaud, pharmaciens.

Introduction

Les microsporidies sont des parasites ubiquitaires et non spécifiques de l'homme qui infectent, puis utilisent le matériel et l'énergie de leur hôte pour se développer. Deux espèces particulières, *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis*, sont responsables de diarrhées chroniques et de perte de poids chez l'homme. Ce type d'infection est généralement asymptomatique chez l'homme sain, mais peut aggraver le pronostic vital de patients immunodéprimés.

Le Vietnam, terre d'Asie du Sud Est, est un pays en plein essor économique. Avec ce développement fulgurant, le niveau de vie de la population se scinde entre les régions urbanisées et la campagne. De même, la situation sociale reste instable, notamment en matière de santé. D'après les organisations internationales, l'épidémie de SIDA n'y a pas encore atteint son plafond, et les traitements de trithérapies ne sont, pour le moment, pas accessibles pour les malades.

Les microsporidies étant des parasites opportunistes, il est intéressant d'étudier leur prévalence, et ce particulièrement dans des régions où les conditions de vie, et d'hygiène restent moindre comparées à celles des pays industrialisés. De plus, le Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes ayant créé une collaboration scientifique avec l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoi, dans le Nord du Vietnam, le projet de la mise en place d'une étude de dix mois à Hanoi a été concrètement réalisable. Cette étude avait pour but d'étudier la prévalence des microsporidioses intestinales chez les patients immunodéprimés, notamment sidéens, de la province de Hanoi et aux alentours.

Sommaire

Première partie

A. Généralités sur les microsporidies..... p 9

1. Découverte.....p 9
2. Caractéristiques biologiques..... p 11
 - a. Généralités
 - b. Particularités biologiques
 - c. Structure de l'organisme
 - d. Différenciation et spécification structurale
3. Taxonomie et phylogénie..... p 17
 - a. Généralités
 - b. Classification
4. Caractères du cycle infectant..... p 22
 - a. La mérogonie
 - b. La sporogonie

B. Epidémiologie des microsporidioses humaines.....p 28

1. Introduction..... p 28
2. Répartition géographique.....p 29
3. Résistance environnementale.....p 30
4. Mode de transmission et sources d'infections..... p 31
 - a. Contamination par l'intermédiaire d'eaux souillées
 - b. Contamination par consommation d'aliments souillés
5. Réservoirs et hôtes.....p 34
 - a. Espèce la plus fréquente chez l'homme : *Enterocytozoon bienersi*
 - b. Espèces moins fréquentes

6. Prévalence.....	p 37
a. <u>Patients non séropositifs</u>	
b. <u>Patients séropositifs</u>	
c. <u>Co-infections</u>	
d. <u>Influence saisonnière</u>	
C. Manifestation clinique chez l’homme.....	p 42
1. Principales manifestations cliniques.....	p 42
2. Effets cliniques liés à l’infection par les genres <i>Encephalitozoon</i> et <i>Enterocytozoon</i>	p 44
a. <i><u>Enterocytozoon bienewisi</u></i>	
b. <i><u>Encephalitozoon intestinalis</u></i>	
D. Méthodes diagnostiques.....	p 47
1. Introduction.....	p 47
2. Diagnostic de microsporidioses humaines.....	p 49
a. <u>Microscopie Electronique à Transmission</u>	
b. <u>Microscopie optique</u>	
E. Traitements des microsporidioses humaines.....	p 61
1. Introduction.....	p 61
2. Les molécules utilisées.....	p 62
a. <u>Albendazole</u>	
b. <u>Fumagilline</u>	
c. <u>Nitoxaxide</u>	
d. <u>Les traitements antiviraux</u>	
3. Schéma thérapeutique.....	p67

Deuxième partie

A. Cadre de l'étude..... p 69

1. Cadre socio-géographique..... p 69
 - a. Parasite méconnu
 - b. Partenaires
2. Pays en voie de développement..... p 72
 - a. Fiche pays
 - b. Pays en évolution rapide
 - c. Situation de l'épidémie de SIDA
3. Objectifs..... p 79
 - a. Objectifs initiaux
 - b. Objectifs réévalués

B. Matériel et méthodes..... p 80

1. Introduction..... p 80
2. Obtention des échantillons de selles..... p 81
 - a. Recrutement des patients
 - b. Difficultés rencontrées au recrutement des patients
 - c. Répartition du nombre d'échantillons selon les différents établissements
3. Construction d'une fiche épidémiologique..... p 84
4. Mise au point de la technique..... p 86

C. Formation du personnel..... p 90

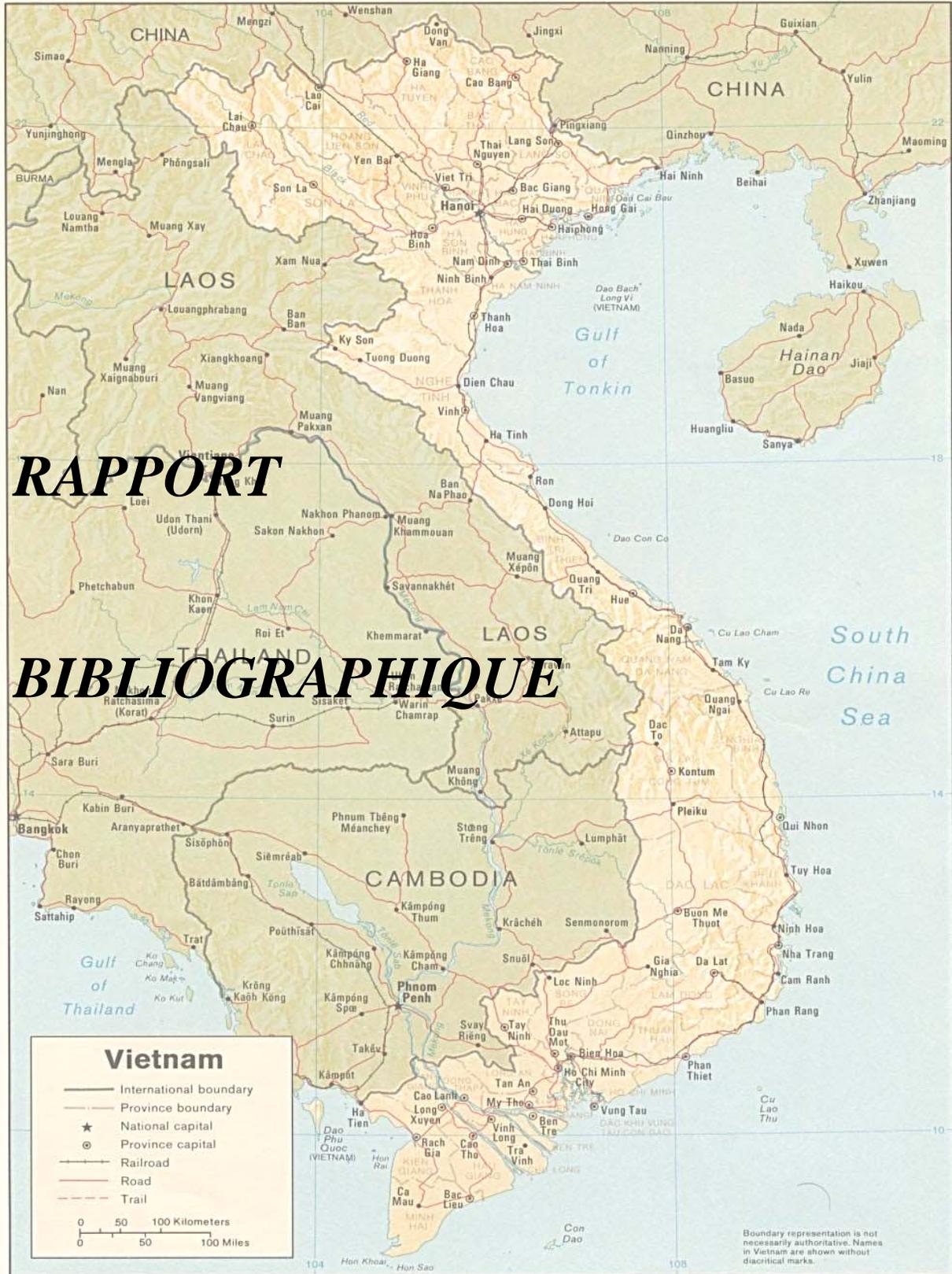
1. Travail de formation pour l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie..... p 90
 - a. Formation initiale
 - b. Formation continue
2. Travail de formation pour d'autres laboratoires..... p 92

D. Résultats expérimentaux.....p93

1. Répartition géographique des échantillons.....p 93
 - a. Répartition sur la région Nord du Vietnam
 - b. Répartition sur la province de Hanoi
2. Résultats généraux..... p 96
 - a. Prévalence de cas douteux
 - b. Répartition des cas douteux par sexe
 - c. Répartition des cas douteux selon l'âge des patients
 - d. Répartition géographique des cas douteux
3. Mise en évidence du premier cas de microsporidiose intestinale à ***Enterocytozoon bienewisi*** à Hanoi..... p 100
4. Mise en évidence du premier cas de microsporidiose intestinale à ***Encephalitozoon intestinalis*** à Hanoi..... p 102
5. Analyse des résultats.....p 103

D. Discussion.....p 105

1. Origine des difficultés.....p 105
2. Conséquences.....p 106
3. Réalisation des objectifs.....p 107



Base 800471 (546744) 12-85

INTRODUCTION

Les microsporidies ou *Microspora*, (photo n°1)¹, sont des organismes unicellulaires largement répandus dans la nature, à la fois parasites des vertébrés et des invertébrés. Elles sont effectivement connues pour infecter fréquemment les insectes, les poissons et les mammifères. Elles ont attiré, et attirent toujours la curiosité des biologistes depuis plus de cent ans.

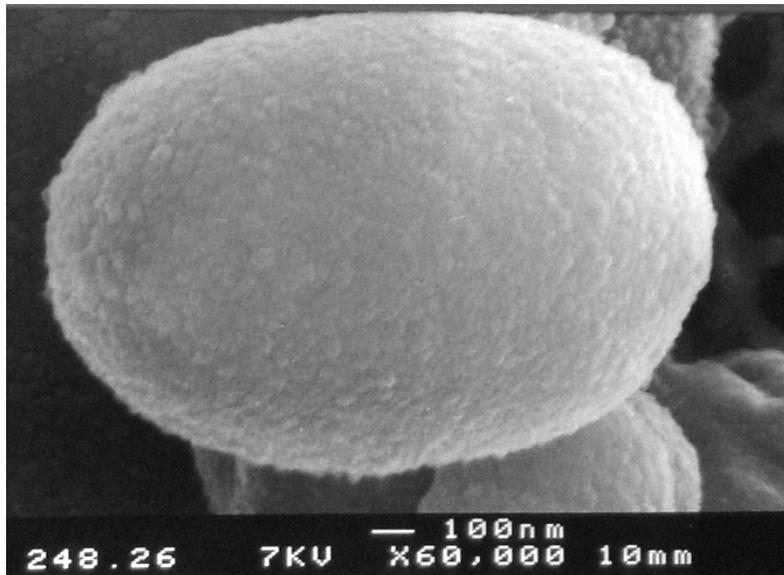


Photo n°1 : Photo en MEB présentant une spore d'*Enterocytozoon bienewisi*.

Comme beaucoup d'autres groupes de parasites intracellulaires, les microsporidies se sont sensiblement spécialisées et ont adopté un mécanisme infectieux unique, extrêmement sophistiqué par adaptation à leurs différents hôtes. Ces adaptations sont principalement caractérisées par une réduction de leur morphologie et de leur ultrastructure, de la chaîne métabolique, et au niveau moléculaire des gènes et du génome.

¹ Photo n°1 : Spore d'*Enterocytozoon bienewisi* en Microscopie Electronique à Balayage, collection du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes.

Les microsporidies sont responsables d'infections chez l'homme. Les deux grands types de pathologies décrites sont, d'une part, des diarrhées chroniques à *Enterocytozoon bieneusi* et d'autre part, des atteintes oculaires à *Encephalitozoon species*. Cependant les microsporidies peuvent causer un éventail d'autres pathologies moins fréquentes, présentant des manifestations cliniques diverses.

Les microsporidioses intestinales sont une des causes principales de diarrhée et perte de poids chez les personnes immunodéprimées telle que les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et chez les patients greffés sous thérapie immunosuppressive. Avec la multiplication des cas de SIDA des années 1980-1990, le nombre de microsporidioses humaines a augmenté significativement. Ce qui porte à croire que les microsporidies sont des parasites opportunistes de l'homme, devenant potentiellement pathogènes à la faveur d'une immunodépression. Cependant il a été décrit dans la littérature de rares cas de microsporidioses, intestinales ou non, chez des sujets immunocompétents (Raynaud et al. ,1998; Thielman et Guerrant, 1998; Okhuysen, 2001, Wichro et al., 2005).

A. Généralités sur les microsporidies

Que sont les microsporidies ?

Selon Balbiani qui crée ce terme en 1882, les microsporidies sont :

« Des organismes caractérisés par la petitesse de leurs spores comparées à celle des autres sporozoaires ».

1. Découverte

La première description remonte à 1857, lorsque Nageli (Nageli, 1857) présente sous le nom de *Nosema bombycis* l'agent mis en cause dans une maladie touchant les vers à soie, *Bombyx mori*. Cette maladie fut responsable d'importants ravages dans les centres d'élevage de Bombyx. En effet, *Nosema bombycis* parasitent les glandes séricigènes des larves et les empêchent de tisser leur coton, ce qui a mis en péril toute la production de soie européenne. Nageli considéra alors cette espèce comme appartenant au genre Schyzomycète de la classe des champignons, même si la classification à cette époque ne relevait pas de la diversité de la vie microbienne et parasitaire (Keeling et al., 2002).

Quelques années plus tard, Balbiani (1882) créa un nouveau groupe pour l'espèce *Nosema* qu'il appela *Microsporidia*.

Mais ce n'est qu'en 1985 que Modigliani (Modigliani et al. , 1985) décrit le premier cas de microsporidiose intestinale chez l'homme. La même année, Desportes-Livage (Desportes et al.1985,) identifie *Enterocytozoon bienewisi* dans des biopsies d'un patient haïtien, sidéen, souffrant de diarrhée chronique. Une autre espèce, *Septata intestinalis* fut, depuis, isolée dans le même contexte(Del Aguila, 1997).

Les microsporidies ont été découvert par Nageli en 1857, alors qu'il recherchait la cause responsable de la mort des vers à soie des élevages de Bombyx. Plus d'un siècle plus tard, en 1985, Modigliani et Desportes ont mis en évidence les premiers cas de microsporidioses humaines chez des patients atteints du virus du Sida.

2. Caractéristiques biologiques

a. Généralités

Les microsporidies sont des parasites unicellulaires eucaryotes présent chez les protistes libres (ciliés), ou parasites (apicomplexes) et chez les métazoaires libres ou parasites tels que les mixosporidies, plathelminthes, insectes, crustacées, poissons, oiseaux ou mammifères (Canning, 1989). Ce qui laisse penser que les microsporidies ont probablement infecté le même hôte que ces protistes et au fil des années se sont adaptées à leurs voisins pour les parasiter à leur tour.

Actuellement les microsporidies sont connues pour être un groupe extrêmement diversifié de parasites. Plus de 1200 espèces de microsporidies ont été décrites infectant, à la fois vertébrés et invertébrés (Sprague, 1992, Larson, 1999). Elles sont réparties en 144 genres et constituent le phylum des *Microspora*. Dès lors, quatorze espèces sont connues pour infecter l'homme.

Tableau I : Présentations des espèces les plus communes de microsporidies².

Espèces	Hôte	Habitat	Taille des spores (µm)	Distribution géographique
<i>Glugea anomala</i>	Poissons (<i>Gasterosteus spp.</i>)	Tissus conjonctifs	2 x 6	Antarctique
<i>G. fennica</i>	Poissons (<i>Lota lota</i>)	Tissus sous-cutanés	2,6 x 7	Finlande
<i>G. Truttae</i>	Poissons (<i>Salmon trutta</i>)	Jaune d'œuf	1,5 x 5	Europe
<i>Nosema apis</i>	Abeille (<i>Apis mellifica</i>)	Intestins	5 x 9	Monde entier
<i>Microspoidium ceylonensis</i>	Hommes (SIDA)	Cornée	3 x 5	Monde entier
<i>M. africanum</i>	Hommes (SIDA)	Cornée	3 x 5	Etats-Unis
<i>N. ocularium</i>	Hommes (SIDA)	Cornée	3 x 5	Europe
<i>Vittaforma cornea</i>	Hommes (SIDA)	Cornée	3 x 5	Etats-Unis
<i>Brachiola vesicularum</i>	Hommes (SIDA)	Muscles	3 x 4	Etats-Unis
<i>B. connori</i>	Hommes (SIDA)	Tous les organes	2 x 2,9	Etats-Unis
<i>Pleistosphora typicalis</i>	Hommes (Immunodéprimés)	Muscles squelettiques	2 x 4	Etats-Unis
<i>P. anguillarum</i>	Poissons (plusieurs espèces marines)	Muscles squelettiques	2,3 x 4,4	Etats-Unis
<i>P. danilewski</i>	Poissons (anguilles)	Muscles squelettiques	3 x 5	Japon/ Taïwan
<i>Trachipleistophora hominis</i>	Reptiles, grenouilles	Muscles	4 x 2	Europe
<i>T. anthropoptera</i>	Hommes (SIDA)	Plusieurs organes	2,4 x 4	Europe
<i>Loma branchilis</i>	Hommes (SIDA)	Branchies	2 x 3,7	Europe, Etats-Unis
<i>Thelohania californica</i>	Poissons (<i>Gadus spp.</i>)	Corps gras, intestins	2,3 x 4,8	Arctique
<i>T. baueri</i>	Moustiques (<i>Culex spp.</i>)	Oocytes/ovaires	3 x 6	Amérique
<i>Ichthyosporidium giganteum</i>	Poissons (espèces marines)	Tissus conjonctifs	2,7 x 5,4	Golfe de Finlande
<i>Microsporidium cotti</i>	Poissons (espèces marines)	Testicules	4 x 7	Côte atlantique
<i>M. schuetzi</i>	Grenouilles (<i>Rana spp.</i>)	Oocytes	9 x 3	Côte atlantique
<i>Encephalitozoon lacertae</i>	Lézards (<i>Podarcis spp.</i>)	Epithélium de l'intestin	7 x 2	Etats-Unis
<i>E. cuniculi</i>	Lapins, rats, souris (<i>Mastomys spp.</i>), cochons guinéens, hamsters, chèvres, moutons, chiens, renards, mustelidae, singes, hommes	Intestins, plusieurs organes, cultures de tissus	3,5 x 1,5 2,5 x 1,5	France Monde entier
<i>E. helleri</i>	Hommes (SIDA)	Plusieurs organes	2,4 x 1,5	Monde entier
<i>E. intestinalis</i>	Hommes (SIDA)	Plusieurs organes	2,0 x 1,5	Monde entier
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Hommes (SIDA)	Intestins, poumons	1,5 x 0,5	Monde entier

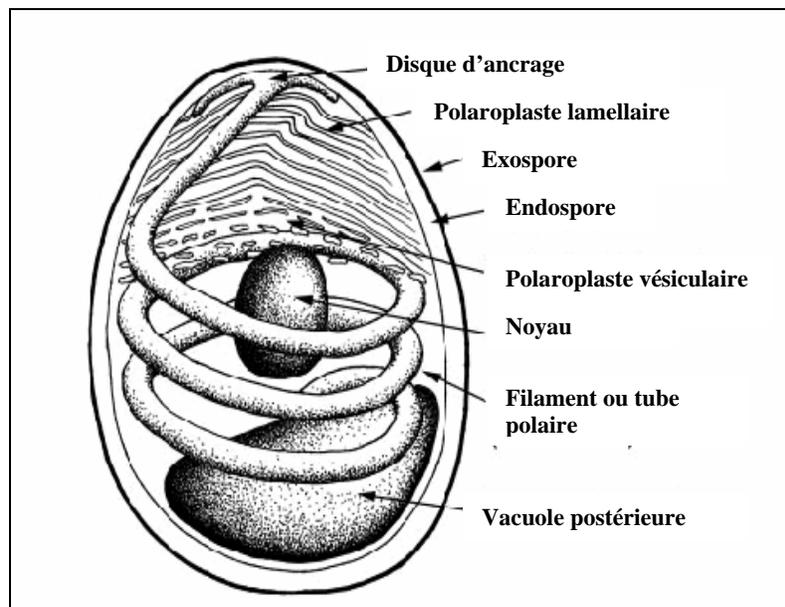
² Tableau I: Bryan and Schwartz, 1999, The Microsporidia and Microsporidiosis, American society of Microbiology, Washington, Wittner M., Weiss L(Eds).

b. Particularités biologiques

Au regard de leur grande diversité dans le monde animal, les microsporidies peuvent être utilisées à des fins de productivité dans le monde agricole. Pour exemple, elles servent en lutte biologique contre les insectes, en apiculture et en aquaculture (Becnel, 1999; Shaw, 1999). D'après Canning, ce sont les microsporidies qui offrent le plus de potentiel en lutte microbiologique en tant qu'organismes unicellulaires eucaryotes (Canning, 1982). Chez les microsporidies du genre *Nosema*, l'infection se réalise par ingestion des spores, celles-ci germent dans le tube digestif et traversent les tissus épithéliaux. Dans le cytoplasme, l'agent infectieux se multiplie et produit d'autres spores qui vont envahir l'insecte et ainsi, par transmission verticale, infecter la génération suivante. Elles provoquent alors des maladies chroniques à évolution lente appelées enzooties, qui affaiblissent et affectent la croissance ou la fécondité de leur hôte plutôt que d'entraîner une mort rapide (Poinar et al., 1985; Cloutier, 1992).

c. La structure de l'organisme

Les caractères très particuliers des microsporidies justifient leur appartenance à un phylum indépendant, le phylum *Microspora*. Ce phylum est caractérisé par des parasites intracellulaires obligatoires, à spore unicellulaire, renfermant un sporoplasme uni ou binucléé, avec un appareil d'extrusion plus ou moins complexe et pourvu d'un tube polaire, permettant l'injection du sporoplasme dans la cellule hôte (Canning, 1986).



³ Schéma n°1 : Schéma général d'une spore de microsporidies quelque soit l'espèce.

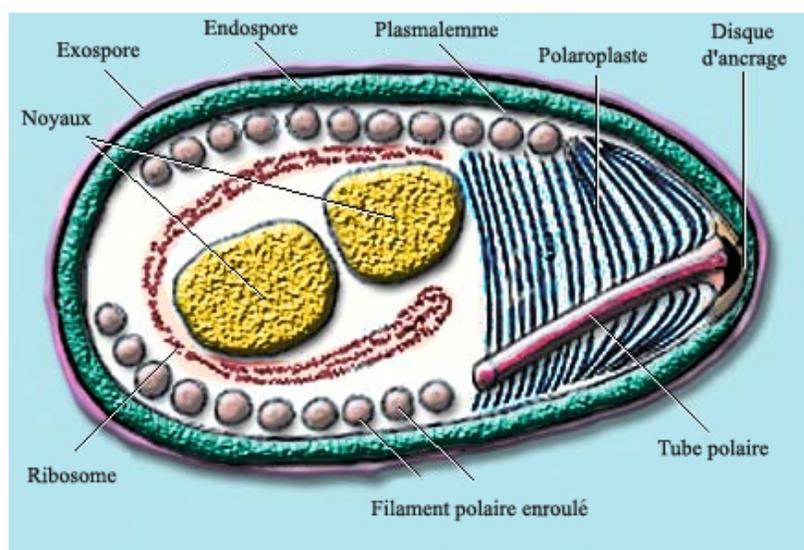
La structure des spores infectantes de microsporidies est très caractéristique. Elles sont petites, mesurant $1.0-3.0 \mu \times 1.5-4.0 \mu$ (Vavra, 1999; Desportes-Livage, 2001; Canning, 2000). Leur forme est le plus souvent ovale, voir ronde.

³ Schéma n°1: Keeling and Fast. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced intracellular parasites, Revue annuelle Microbiologie, 2002.

L'**exospore** composé d'éléments glycoprotéiques et l'**endospore** composé de chitine, leur assurent une très grande résistance dans l'environnement. De plus la présence du **plasmalemme** permet une diffusion d'ions et d'autres petites molécules entre le cytoplasme de la spore et le milieu extérieur. Le **filament polaire** observable en Microscopie Electronique à Transmission (MET) apparaît enroulé de façon très organisée à l'intérieur du plasmalemme. Il est fixé à une zone très dense à l'extrémité antérieure de la spore, également appelée **disque d'ancrage**.

Le **polaroplaste** composé de vésicules, et d'épaisses couches de membranes entremêlées, occupe le tiers et jusqu'à la moitié du volume de la spore.

Le matériel génétique est contenu dans un seul **noyau** ou bien dans un diplokaryon, résultat de la fusion de deux *nuclei*. Le cytoplasme est riche en **ribosomes** et est pourvu d'un réticulum endoplasmique.



⁴ Schéma n°2 : Schéma général d'une spore de microsporidie.

⁴ Schéma n°2 : Site internet Paleos, www.palaeos.com/.../Images/GeneralizedSpore.jpg, consulté le 12 Avril 2005.

d. Différenciation et spécification structurale

Le tableau II présente quelques différences structurales utilisées pour la différenciation des spores de microsporidies en espèces.

Genres	Espèces	Taille µm	Nombre de spires	Alignement	Noyau
<i>Encephalitozoon</i>	<i>cuniculi</i>	1.5 - 0.5	6	simple	unique
	<i>hellem</i>	1.5 - 0.5	6	simple	unique
	<i>intestinalis</i>	4.0 - 2.0	4 à 8	simple	unique
<i>Enterocytozoon</i>	<i>bieneusi</i>	1.5 - 1.0	5 à 6	double	unique
<i>Vittaforma</i>	<i>corneae</i>	3.7 - 1.0	5 à 6	simple	diplokaryon
<i>Pleistosphora</i>	<i>species</i>	3.5 - 2.5	11	double	unique
<i>Nosema</i>	<i>species</i>	5.0 - 3.0	7 à 12	simple	diplokaryon
<i>Trachipleisto- sphora</i>	<i>hominis</i>	4.0 - 2.4	11	double	unique
	<i>anthropophthera</i>	3.7 - 2.0	11	double	unique

⁵ Tableau II : Caractéristiques structurales des différentes espèces de microsporidies

Les microsporidies constituent un groupe extrêmement diversifié de parasites. La forme et la taille de leurs spores infectantes sont caractéristiques. En effet, elles sont petites (1.0-3.0 µ×1.5-4.0 µ), et de forme ovale à ronde. Elles sont pourvues de noyaux et d'un filament polaire qui constitue le matériel infectant. Leur membrane externe (exospore) composée de chitine leur assure une très grande résistance dans l'environnement.

⁵ Tableau II : Bettens, 1999 ; Keeling, 2002. Les infections à microsporidies, Louvain med. 118: 446-456, 1999.

3. Taxonomie et phylogénie.

a. Introduction

La classification des microsporidies a intrigué et intrigue toujours de nombreux spécialistes. Nageli identifia la première microsporidie, *Nosema bombycis*, en 1857 et classa cet organisme chez les Schizomycètes (Nageli, 1857). En 1882, Balbiani créa l'ordre des *Microspora*; et en 1976, Sprague établit pour la première fois, le phylum des *Microspora*. Enfin, Lévine, en 1980, les classe dans le sous règne des *Protozoa* et le règne des Protistes (Balbiani, 1882; Levine et al., 1980; Wittner, 1999). En 1982, Balbiani modifia le nom du phylum et le nomma *Microsporidia* (Sprague et Becnel, 1998)

b. Classification

Les microsporidies ont été historiquement définies par rapprochement à certaines spécificités structurales d'autres parasites intracellulaires comme les Myxosporidies, les Actinomycètes, Haplosporidies et les Protozoaires.

- Les microsporidies chez les protozoaires.

Beaucoup d'études du 20^{ème} siècle ont associé les microsporidies au règne des protozoaires. Différentes classifications taxonomiques ont été publiées, pour lesquelles la définition des espèces repose sur les particularités cytologiques, celle des genres et familles sur les modalités du développement ou les hôtes. En ce qui concerne la subdivision en sous-ordre, famille ou genre, elle repose surtout sur les modalités de la mérogonie et de la sporogonie (étapes du développement des microsporidies), et l'appariement des noyaux en diplocaryons permanent chez certaines espèces, alors que jamais observé chez d'autres. Enfin chez certaines microsporidies, les noyaux sont appariés à la mérogonie et leur fusion précède la méiose et la production de spores haplocaryotiques.

Ainsi, la classification de Tuzet (1971), revue par Lévine (1980), se base sur l'ultrastructure de l'organisme, c'est à dire :

- sur la taille,
- la présence d'un sporoplasme uni ou binucléé,
- la morphologie des différents stades au cours du développement,
- le mode de division,
- l'interaction hôte parasite,
- le nombre de spires du tube polaire,
- et la présence ou non d'une membrane persistante autour des sporoblastes, les isolant du cytoplasme de la cellule hôte.

On pouvait alors distinguer deux sous-ordres, les *Pansporoblastinoe* (présence de la membrane) et les *Apansporoblastinoe* (absence de la membrane).

La classification de Sprague, proposée en 1977, puis revue en 1992 repose, quant à elle, sur le type de division chromosomique (cf page suivante). Pour lui, les seules différences ultrastructurales ne suffisent pas à différencier certains genres et espèces. Il se base alors sur les travaux de Didier, qui, à partir de prélèvements de cornée de trois patients sidéens atteints de kératoconjonctivite, réussit à cultiver des spores morphologiquement identiques mais ayant un profil différent après étude en Western Blot (Didier, 1991).



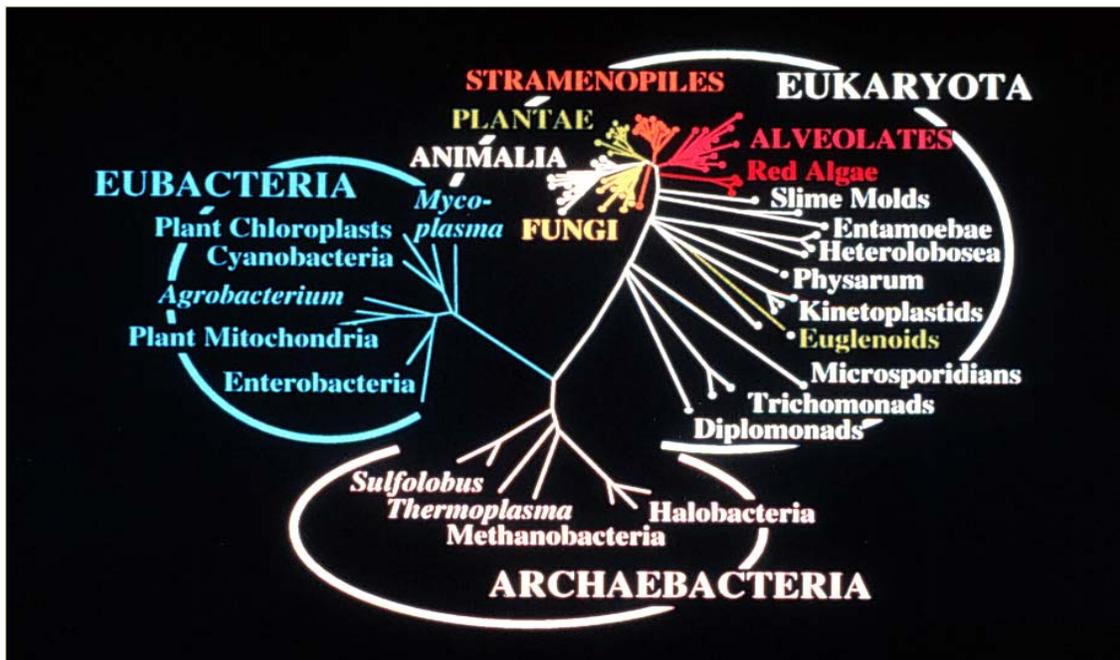
⁶ Schéma n°3 : Classification de Sprague, 1977.

⁶ Schéma n°3 : Desportes I. Evolution de la notion de spécificité parasitaire chez les microsporidies, conférence « Evolution des parasites et des relations hôtes parasites » à l'école doctorale, 2-3-4 mai 2001.

- De nouvelles orientations

Depuis quelques années, et grâce aux nouvelles possibilités offertes par les techniques de biologie moléculaire (PCR, hybridation, RFPL...), de nouvelles orientations apparaissent.

Différentes particularités telles que l'absence de mitochondries et de péroxysomes, l'organisation atypique du golgi, l'ARN ribosomique de type bactérien ainsi que la très petite taille du génome (2.3 Mpb chez *Encephalitozoon intestinalis*) suggèrent que les microsporidies seraient parmi les eucaryotes les plus primitifs, situés à la base de l'arbre phylogénétique (T. Cavalier-Smith, 1998).



⁷ Schéma n°4 : Arbre phylogénétique basé sur l'étude des séquences SSU rRNA, selon Cavalier-Smith (1998).

⁷ Shéma n°4 : Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev., 1998, 73: 203-266

Cependant plusieurs arguments contredisent cette hypothèse :

- La mise en évidence de séquences codant pour une protéine de stress (hsp70) adressée aux mitochondries et la valyl-tRNA synthétase (ValRS) indique que les microsporidies dérivent d'une lignée ancestrale déjà pourvue de ces organites (Keeling, 2002).

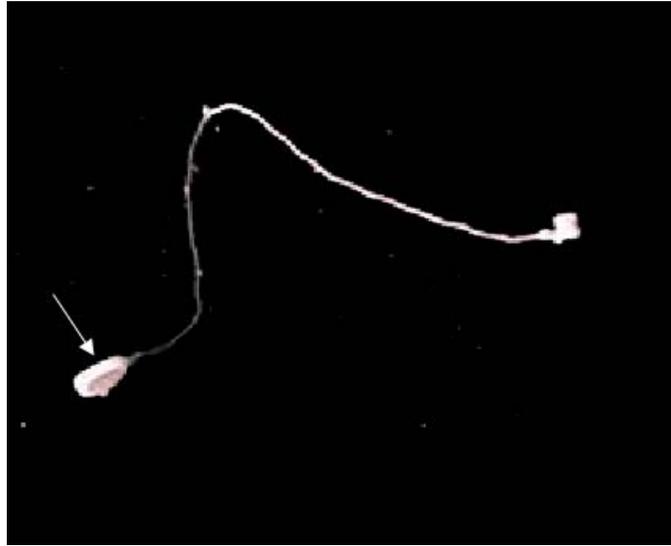
- Les microsporidies partagent avec les champignons diverses particularités :

- appariement des noyaux en dicaryons,
- mitoses semblables à celles des levures,
- présence de tréhalose et de chitine dans la spore, homologues au niveau des gènes codant pour la tubuline b
- thymidylate synthase et dihydrofolate réductase codées par des gènes différents...

Toutes ces données sont les raisons du classement actuel du phylum des *Microsporidia* dans le règne des *Fungi* (Weiss et Vossbrink, 1998 ; Mathis, 2000).

La classification phylogénique des microsporidies a été un sujet de divergence entre les chercheurs du 20^{ème} siècle. De Schizomycètes à leur découverte, elles ont été reclassées dans la classe des protozoaires. Cependant, avec l'arrivée de la biologie moléculaire dans les années 90, les spécialistes constatent un rapprochement phylogénétique très fort avec la classe des *Fungi* (champignons).

4. Caractéristiques du cycle infectant

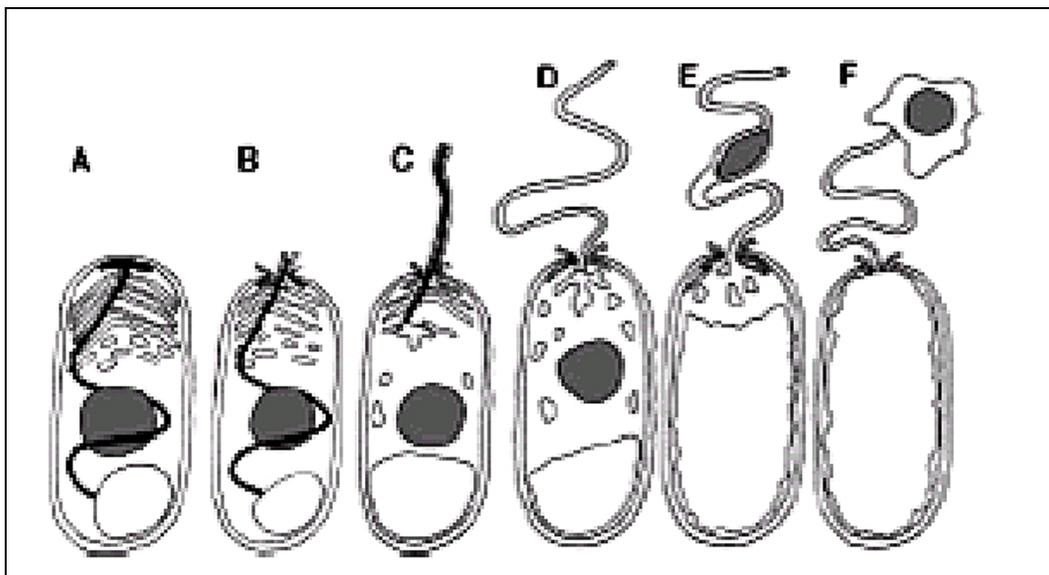


⁸ Photo n°2 : Germination d'une spore de *Nosema algeriae* en Microscopie Electronique à Balayage.

Pendant la phase infectante, les spores de microsporidies entrent en contact avec un hôte, le plus souvent par voie digestive, plus rarement par voie aérienne et exceptionnellement par contact direct (traumatisme, inoculation directe au niveau cornéen par voie aérienne ou probablement par l'intermédiaire de doigts souillés). Le filament polaire qui permet, entre autre, la distinction des microsporidies par rapport aux autres organismes unicellulaires constitue le matériel infectant de la spore.

⁸ Photo n°2: Center of Disease Control. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>, consulté le 2 juin 2005.

Une modification de la pression osmotique ou du pH interne de la cellule produit un influx d'eau dans la spore (A), ce qui génère un gonflement de la vacuole postérieure et un déroulement du filament polaire. Celui-ci perce alors la paroi parasitaire à l'endroit le plus fin, c'est-à-dire au niveau du disque d'ancrage (B, C, D). La pression ainsi générée déclenche la propulsion du noyau et du matériel cytoplasmique à travers le filament polaire (E) qui formeront une entité infectante : le sporoplasme (F) (Keeling, 2002). Le sporoplasme comprend un noyau unique arrondi, un réticulum endoplasmique et de nombreux ribosomes. Sa multiplication aboutit à la formation de deux cellules accolées aux deux noyaux distincts, apparaissant liées à une mitochondrie de la cellule hôte (dépendance énergétique).



- ⁹ Schéma n°5 : Schéma du mécanisme infectieux d'une spore de microsporidies :
- (A) Spore infectante à l'état latent,
 - (B) Le polaroplaste perce la membrane de la spore au niveau du disque d'ancrage,
 - (C) Eversion du filament polaire,
 - (D) Passage du matériel infectant,
 - (E) A travers le tube polaire,
 - (F) Sporoplasme infectant émerge du tube polaire et est protégé par une nouvelle membrane.

⁹ Schéma n°5: Keeling, *Microsporidia* : Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2002,56, 93-116.

Une fois infectée, la cellule hôte va connaître deux étapes de reproduction. La première phase de **prolifération** (asexuée), puis la seconde de **maturation** (sexuée), vont permettre la transformation du sporoplasme en trophozoïte, schizontes, mérozoïtes, sporontes, sporoblastes et enfin en spores qui seront expulsées en entraînant la mort de la cellule.

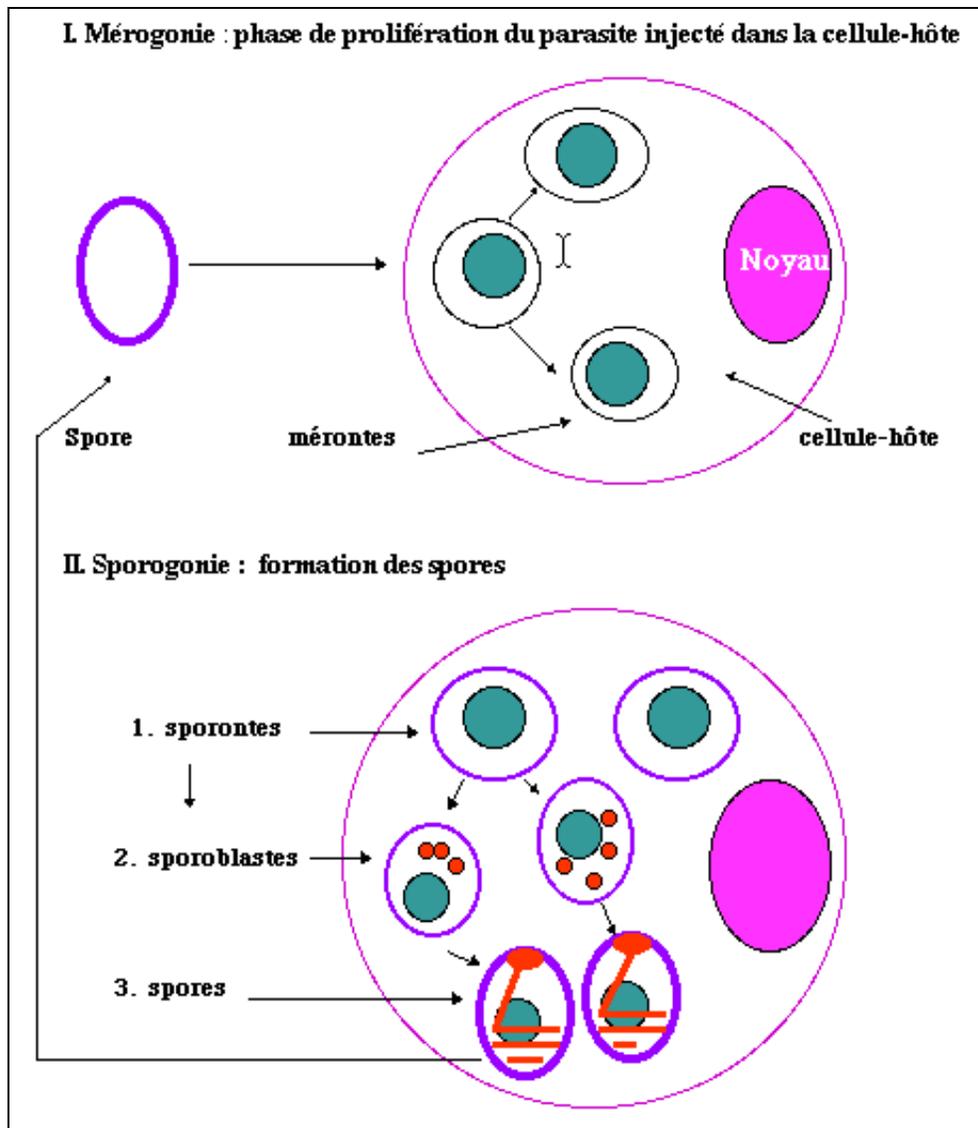
a. Phase 1 : La mérogonie

La mérogonie est la phase de prolifération qui suit l'inoculation du sporoplasme dans le cytoplasme de la cellule hôte. Le sporoplasme aboutit à la formation de mérontes par divisions successives. Les mérontes sont des cellules anucléées, à structure simple de 4 à 5 jours, à faible différenciation cytoplasmique et entourées d'une membrane simple. Le phénomène de caryokinésie (division du noyau) se produit plus vite que la cytokinésie (division cellulaire), ce qui explique la formation de structures plasmodiales multinucléées. La division peut se faire de façon binaire (mérogonie) ou de façon multiple (schizogonie). Le méronte va finir par éclater et libérer des mérozoïtes qui vont disséminer de proche en proche et envahir les cellules adjacentes, entraînant ainsi la dissémination du parasite.

b. Phase 2 : La sporogonie

Faisant suite ou concomitante à la mérogonie, la sporogonie ou phase de maturation aboutit à la formation de sporontes. Les sporontes présentent une surface amorphe dense entourant la cellule. Ils évoluent pour former des sporoblastes puis des spores infectantes par un processus de division maturation. Les spores sont ensuite éliminées vers le milieu extérieur par les fécès, l'urine, ou la peau, en fonction des espèces. Elles peuvent rester infectieuses dans la nature pendant des mois du fait de leur grande résistance. Les caractéristiques générales des organismes à différentes étapes de l'évolution sont :

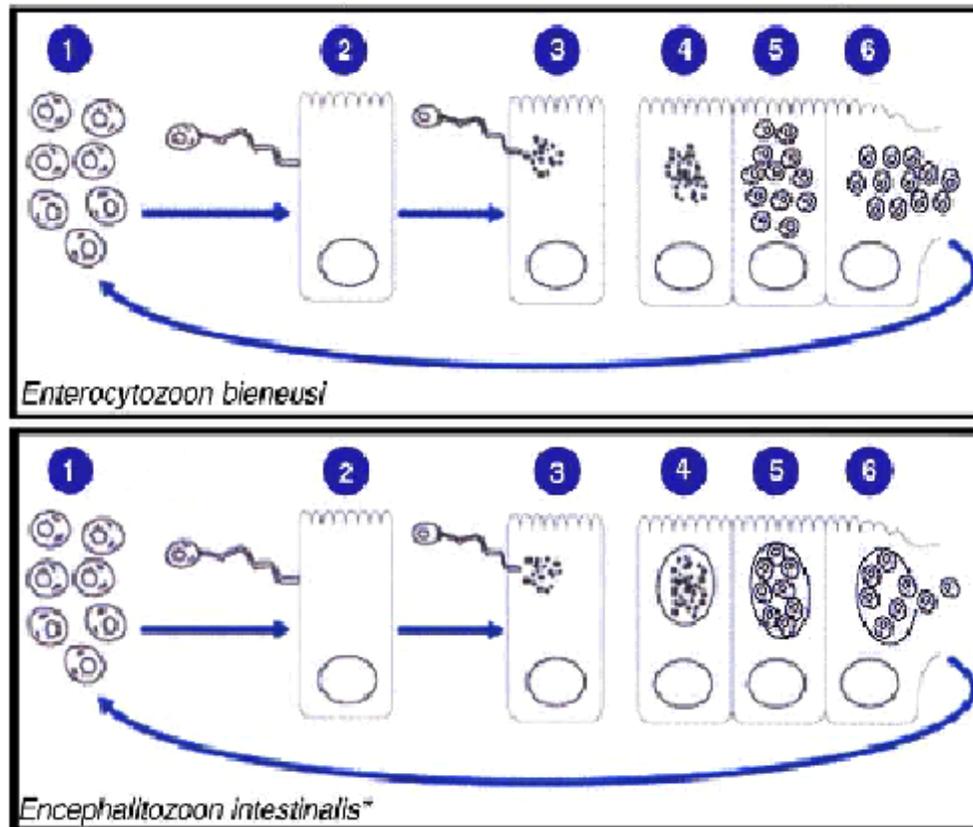
- Sporonte : La sporogonie débute par un dépôt de matériel sécrété à la surface de la cellule parasitaire, entraînant un épaissement et un aspect écaillé de la surface du parasite.
- Sporoblaste : La transformation en sporoblaste suit la dernière division cellulaire du sporonte. La maturation du sporoblaste se poursuit et on observe alors l'apparition de quelques spires sur le tube polaire, du disque d'ancrage et la classification du cytoplasme.
- Spore : La spore est le dernier stade de maturation.



¹⁰ Schéma n°6: Schéma du développement de la spore de microsporidie selon les deux phases sexuée et asexuée (Desportes, 2001).

¹⁰ Schéma n°6 : Desportes I. Evolution de la notion de spécificité parasitaire chez les microsporidies, conférence « *Evolution des parasites et des relations hôtes parasites* » à l'école doctorale, 2-3-4 Mai 2001.

Les stades de sporogonie peuvent différer selon les espèces. Par exemple, *Encephalitozoon intestinalis* nécessite la formation d'une vacuole parasitophore au sein de la cellule hôte, alors que les spores sont libres dans la cellule hôte pour *Enterocytozoon bieneusi*.



¹¹ Schéma n°7 : Développement asexué de *E. intestinalis* et *E. bieneusi*.

Les spores de microsporidies sont infectantes par un mécanisme d'expulsion et d'extrusion du matériel infectant contenu dans la spore par un tube polaire, dans la cellule hôte. Elles se développent ensuite en deux étapes, l'une sexuée, la mérogonie, et l'autre asexuée, la sporogonie. Les spores matures sont disséminées dans le milieu extérieur par éclatement de la cellule hôte, et contaminent les cellules adjacentes.

¹¹ Schéma n°7: Center for Disease Control, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>. Comparaison du développement de *E. intestinalis* et *E. bieneusi*, consulté le 22 mai 2005

B. Epidémiologie des microsporidioses humaines

1. Introduction

Les critères retenus par les autorités de santé afin de caractériser un agent pathogène comme responsable de maladies infectieuses émergentes à risque épidémique sont :

- son apparition récente chez l'homme et /ou chez l'animal
- son expansion géographique
- son incidence croissante
- son développement rapide ou l'apparition de nouveaux mécanismes

de résistance (Didier 2005).

Les microsporidies présentent aujourd'hui une partie de ces caractéristiques. En effet, la découverte récente de nouvelles espèces, la découverte récente d'infection chez l'homme immunodéprimé, comme sain, ainsi que l'expansion géographique mondiale des infections, imposent de les considérer étiologiquement comme des agents responsables de maladies infectieuses émergentes.

La découverte récente de nouvelles espèces, d'infections chez l'homme immunodéprimé, comme sain, ainsi que l'expansion géographique mondiale des infections, imposent de considérer les microsporidies comme des agents responsables de maladies infectieuses émergentes.

2. Répartition géographique

Les microsporidies humaines sont ubiquitaires et cosmopolites. On les retrouve sur tous les continents, excepté l'Antarctique. Des cas de microsporidioses ont été rapportés aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement :

- Argentine,
- Australie,
- Botswana,
- Brésil,
- Canada,
- République Tchèque,
- France, Allemagne,
- Inde,
- Italie,
- Japon,
- Pays Bas,
- Nouvelle Zélande,
- Espagne,
- Sri Lanka,
- Suède,
- Suisse,
- Thaïlande,
- Uganda,
- Royaume Unis,
- Etats Unis,
- et Zambie.

Les microsporidies sont des parasites ubiquitaires et ont été retrouvées autant dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, c'est-à-dire, où elles ont fait l'objet de recherche.

3. Résistance environnementale

Un grand nombre d'hôtes, comme les insectes et autres classes de vertébrés, sont sensibles aux microsporidioses et, de ce fait dispersent les spores infectantes dans l'environnement. La chitine contenue dans la membrane des spores leur apporte une grande résistance dans l'environnement, et ce à de variables conditions physiques ou chimiques.

Dès 1978, Shaddock et Polley ont évalué la résistance des spores d'*E. cuniculi* à différentes conditions expérimentales. Les résultats sont probants:

- Les spores déshydratées, puis incubées à 22 °C à 0-2 % d'humidité relative restent infectieuses pendant 28 jours ;
- L'incubation dans l'eau distillée ou la congélation ne tue pas les spores ;
- Les spores incubées à pH 4 et pH 9 survivent au maximum 24 heures (Shaddock et Polley, 1978).

De même en 1979, Weller a découvert que les spores de *E. cuniculi* demeurent infectantes sur une culture de tissus pendant 16 jours à 22 °C et 98 jours à 4°C (Didier, 2005).

Dans son étude en 1999, Koudela parvient à la même conclusion concernant la survie des spores de *E. cuniculi* dans l'environnement. Il démontre qu'un nombre suffisant de spores, pouvant causer des infections létales, restent infectantes après une incubation de 2 ans à 4 degrés ou une congélation à -12 et -24°C pendant 24h (Koudela, 1999). Plus récemment en 2003, Li démontra que *E. intestinalis* et *E. hellem*, tout comme *E. cuniculi*, restent infectantes vis a vis de cultures de cellules, après une incubation dans l'eau à des températures croissantes de 10 à 30°C, de plusieurs semaines à quelques mois (Li et al. 2003). Il détermina alors que *E. intestinalis* est plus résistant encore que *E. hellem* et *E. cuniculi*.

Les différentes études de culture et survie des spores de microsporidies dans diverses conditions de température et d'humidité prouvent que les microsporidies développent une très forte résistance dans l'environnement et restent de longues années potentiellement infectante pour leurs hôtes respectifs.

4. Mode de transmission et sources d'infections

Il existe encore de grandes lacunes dans les connaissances scientifiques concernant l'origine et le mode de transmission des microsporidioses humaines. Les microsporidies sont rejetées dans l'environnement sous formes de spores infectantes, et ce par l'intermédiaire des selles, des urines et des sécrétions bronchiques. Les hommes et les animaux infectés (hôtes) sont donc de possibles sources de contamination.

La contamination oro-fécale semble l'hypothèse la plus envisagée actuellement. Les spores peuvent être véhiculées par l'intermédiaire de l'eau et/ou d'aliments souillés, et des mains sales.

a. La contamination par l'intermédiaire d'eaux souillées

Des études en France et aux Etats Unis ont montré la présence de spores d'*Enterocytozoon bienewisi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Nosema species*, *Pleistospora species* et *Vittaforma corneae* dans des eaux de surface, des eaux d'égouts non traitées, et des sources d'irrigation (Avery and Undeen, Sparfel et al. 1997, Dowd et al.1998, Fournier et al 2000, Thurston-Enriquez et al. 2002).

De même, des spores d'*Enterocytozoon bienewisi* ont été identifiées dans des selles d'animaux marins de surface (Sulaiman et al., 2003).

Enfin, en France, un taux important de cas de microsporidioses a été rapporté chez des habitants au voisinage d'une usine de distribution d'eau (Cotte et al., 1999) .

b. La contamination par consommation d'aliments souillés

Le risque de transmission par l'alimentation croît avec la globalisation des aliments, leur transport, le nombre important de voyageurs consommateurs, et le changement dans la conception même du mode d'alimentation (Slifko et al, 2000).

En 1993, Mc Dougall a mis en évidence des organismes appartenant au genre *Nosema* à l'intérieur de cellules de muscles striés et dans les selles d'un patient séropositif. Le patient n'a développé aucun signe clinique malgré la présence de microsporidies. Les scientifiques, comme Hutin en 1998, ont alors conclu que la présence de ces organismes était due à une transmission accidentelle par l'alimentation et non pas à une réelle infection de l'organisme (Didier, 2005).

En 2002, Buckholt a identifié *E. bienewisi* dans la viande de porc d'un abattoir du Massachusetts aux Etats Unis. Son étude établie alors que la cuisson suffisante de la viande peut éviter la transmission de spores.

Des études morphologiques et phylogéniques ont également rapporté que les microsporidies du genre *Pleistosphora*, touchant principalement les poissons et insectes, sont capables d'infecter l'homme par consommation de poissons contaminés. (Chupp et al. 1993; Vavra et al., 1998).

Enfin, plus récemment, Thurston et Enriquez ont découvert des organismes d'*E. intestinalis* dans l'eau d'irrigation des productions de céréales aux Etats-Unis (Thurston-Enriquez, 2002). La présence de ces parasites pathogènes humains dans les eaux utilisées pour l'irrigation de récoltes traditionnellement consommées crues suggère qu'il puisse y avoir un risque infectieux pour les consommateurs qui entrent en contact ou mangent ces produits.

En conséquence à ces nouvelles données, l'Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis a inscrit *E. bienewsi* et *E. intestinalis*, les deux microsporidies les plus communément identifiées chez l'homme, dans la liste des contaminants microbiens répondant aux "Safe Drinking Water Act", c'est à dire des règles de consommation d'eau pour une sécurité maximale. De plus, l'Institut National de la Santé et les Centres de Contrôle et Prévention des Maladies (CDC) ont intégré les microsporidies dans la catégorie B des pathogènes prioritairement contaminant dans l'eau.

Différentes études attestent que la contamination de microsporidies, notamment *E. bienewsi* et *E. intestinalis*, par voie oro-fécale est l'hypothèse la plus envisagée actuellement, contamination par l'intermédiaire de l'eau et/ou d'aliments souillés, des mains sales. Les autorités gouvernementales des Etats-Unis, au vu du risque épidémique, ont pris des mesures d'hygiène concernant l'eau consommable de leur pays.

2. Réservoirs et hôtes.

Lorsque les microsporidies ont été décrites pour la première fois dans les années 80, le développement singulier de certaines espèces et les diverses particularités cytologiques laissaient supposer qu'elles étaient spécifiques de l'homme. Cependant le caractère opportuniste des infections a conduit à rechercher d'éventuels réservoirs animaux.

a. Espèces les plus fréquentes chez l'homme :

▪ *Enterocytozoon bienersi*

Plusieurs hôtes ont été identifiés chez les mammifères : lapin, cochon, chien, singe, chat, veau.

L'infection est apparemment asymptomatique chez les animaux immunocompétents (Del Aguila et al., 1999). Différentes études ont permis l'identification de cinq souches chez l'homme (A, B, C, D, G), et ce par l'analyse de la variabilité génétique au niveau d'un fragment de 243 pb de la séquence rDNA ITS . Elles ont ensuite été recherchées chez différents mammifères. Les différences constatées entre les souches humaines et animales suggèrent l'existence d'un réservoir humain naturel de l'infection. La souche humaine D a été identifiée chez des primates immunodéprimés (Didier et al., 1991; Larsson, 2005).

▪ *Encephalitozoon intestinalis*

L'infection est asymptomatique chez les animaux et l'homme immunocompétent. Il apparaît un réservoir asymptomatique étendu parmi différentes espèces animales tels que les ânes, vaches, chèvres, cochons, chiens (Bornay- Llinares et al. 1998)

b. Espèces moins fréquentes :

- *Encephalitozoon cuniculi* : mammifères (rongeurs, carnivores)
(Canning, 1989)

- *Encephalitozoon hellem* : oiseau de volière tels que les perruches et les perroquets, pigeons et les autruches (Black et al., 1997, Haro et al., 2005)

Tous ces hôtes deviennent des sources potentielles de contamination par ingestion, ou dispersion des spores par déjection dans l'environnement.

Génotypes	Hôtes naturels
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	
G.A, G.B, G. C,	homme
G.D	primates : homme, macaque
G. Ebpa, G. Ebpb,	porc
G. Ebpc, G. Ebpd (proches de A et B)	porc
G. indéterminés (proches des G. humains)	chats, chiens
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	
Souche I	lapin, souris, homme
Souche II	renard bleu, souris
Souche III	chien, homme
S. indéterminées	rats, cobaye, porc, hamster, cheval, vache, singe
<i>Encephalitozoon hellem</i>	
G. 1	perroquet, homme
G. 2	homme
G. 3	homme
G. indéterminés	Psittacidae

¹² Tableau III : Caractéristiques morphologiques et épidémiologiques des principales espèces de microsporidies humaines.

¹² Tableau III : Louvain, 1999 .Caractéristiques morphologiques et épidémiologiques des principales espèces de microsporidies rencontrées en pathologie humaine.

Les microsporidies ne sont pas des parasites spécifiques de l'homme.

Les espèces retrouvées le plus fréquemment retrouvées chez l'homme, *E. bienewisi* et *E. intestinalis*, ont également été identifiées chez diverses hôtes mammifères asymptomatiques (rongeurs, carnivores, lagomorphes, ruminants, primates). De même, l'état d'immunodéficience favorise le passage de souches trouvées chez l'animal à l'homme et réciproquement.

3. Prévalence

Les microsporidies sont des parasites ubiquitaires et leurs effets touchent les cinq continents. Cependant, leur taux de prévalence varie très sensiblement de 1 à 50% selon les études. En effet, le mode de recrutement des patients, c'est à dire de la population totale étudiée, patients immunocompétents ou immunodéprimés, séropositif ou séronégatif, avec ou sans diarrhée, est très différent en fonction des études. De même, les méthodes et techniques de diagnostic peuvent faire varier très fortement le résultat ainsi que des techniques de dépistage et d'identification.

a. Patients non séropositifs

Des cas de microsporidies ont été mis évidence, dans la littérature, chez des patients non infectés par le virus du Sida. Ainsi, des infections ont été rapportées avant et depuis le début de l'épidémie de Sida : des cas de microsporidies intestinales chez des voyageurs (Raynaud et al., 1998; Thielman et Guerrant, 1998; Okhuysen, 2001); des infections d'enfants dénutris (Hautvast et al., 1997; Desportes-Livage et al., 1998; Valperga et al., 1999; Mungthin et al., 2001); chez des receveurs de transplants d'organes (Gumbo et al., 1999; Mohindra et al., 2002); et de porteurs de lentilles de contacts (Lewis et al., 2003).

Ainsi, quelques études, présentent des taux moyens de prévalence :

- 3,3 à 10% chez les voyageurs.

Lopez Velez, dans son étude de 2001, a mis en évidence par PCR trois cas de microsporidies intestinales chez des patients immunocompétents, deux voyageurs rentrant d'un cours séjour dans les tropiques et une femme enceinte rentrant d'une longue expatriation sur les îles. De même Muller, en 2001, a examiné les selles de patients rentrant de voyages en régions tropicales. Sur les 148 patients, 9 ont été confirmé par PCR, soit 6% (Lopez-Velez et al.; Muller et al., 2001)

- 4,1 à 17,4% chez les enfants présentant ou non une diarrhée.

Valperga, de Septembre 1995 à Décembre 1997, a analysé les selles de 344 enfants âgés de 1 à 24 mois en microscopie optique uniquement. Il a alors dépisté chez les

enfants souffrant de diarrhées sévères, 12 échantillons positifs sur 122 (soit 7,2%), et chez les enfants dont la diarrhée est moins importante, 10 échantillons positifs sur 122 (soit 8,2%). De même, Tumwine, en 2002, a mis en évidence des cas de microsporidioses confirmés par PCR à *Enterocytozoon bienewisi* à hauteur de 17,4 % chez des enfants souffrant de diarrhées et hospitalisés à Mulago en Uganda ; Mungthin par microscopie optique, puis confirmation par microscopie classique à transmission mis en évidence 112 cas sur 290 (soit 4.1%) chez des enfants immunocompétents d'un orphelinat de Bangkok en Avril 2003 (Valperga et al., 1999; Mungthin, 2003; Tumwine et al. 2002)

- 17,02 % chez les personnes âgées.

Une étude, réalisée en Espagne en 2002, a mis en évidence par microscopie optique 8 cas de microsporidioses intestinales sur 47 patients diarrhéiques soit 17,02% (Lores et al., 2002)

D'autres études plus spécifiques, basées sur des techniques sérologiques ont été testées pour détecter des anticorps spécifiques chez des patients immunocompétents : donneurs de sang, des dresseurs de chiens, des travailleurs forestiers, et des femmes enceintes. Les résultats ont permis de cibler un taux de séroprévalence de microsporidioses de 1,3 à 8%.(Van Gool et al., 1997; Del Aguila et al., 2001; Kucerova et Ditrich., 1998).

Les pourcentages, donnés ci-dessus, sont effectivement variables en fonction des études. Ils sont à prendre avec précaution car tous les échantillons positifs ne sont pas confirmés par une étude en biologie moléculaire par PCR.

Espèces	Localisation	clinique	Statut immunitaire	Prélèvement	Références
<i>E. cuniculi</i>	Japon	attaque d'apoplexie	inconnu	LCR et urine	Matsubayashi 1959
<i>E. cuniculi</i>	Suède	attaque d'apoplexie	faible ratio CD4/CD8	urine, anticorps sériques	Berquist 1994
<i>E. cuniculi</i>	USA	attaque d'apoplexie, décès	greffe rénale	urine, selles, biopsie conjonctivale	Mohindra 2003
<i>E. intestinalis</i>	Suisse	diarrhée aiguë	normal	selles	Flep 1995
<i>E. intestinalis</i>	France (voyage en zone tropicale)	diarrhée	normal	selles	Raynaud 1998
<i>E. intestinalis</i>	France (voyage en zone tropicale)	diarrhée	normal	selles	Raynaud 1998
<i>E. bieneusi</i>	Allemagne (voyage en Egypte)	diarrhée aiguë	normal	selles	Sandford 1994
<i>E. bieneusi</i>	France (voyage en zone tropicale)	diarrhée	inconnu, greffe valve	selles	Deluol 1994
<i>E. bieneusi</i>	France (voyage en zone tropicale)	diarrhée	inconnu	selles	Deluol 1994
<i>E. bieneusi</i>	France (voyage en zone tropicale)	diarrhée	inconnu	selles	Deluol 1994
<i>E. bieneusi</i>	France (voyage en zone tropicale)	diarrhée	inconnu	selles	Deluol 1994
<i>E. bieneusi</i>	France	diarrhée	inconnu	selles	Deluol 1994
<i>E. bieneusi</i>	USA	diarrhée aiguë	greffe hépatique	selles	Sax 1995
<i>E. bieneusi</i>	France	diarrhée, malabsorption	greffe coeur poumon	selles	Monneret 1995
<i>E. bieneusi</i>	Allemagne (voyage en Turquie)	diarrhée aiguë	normal	selles	Sobotka 1995
<i>E. bieneusi</i>	Suisse	diarrhée aiguë	normal	selles	Flepp 1995
<i>E. bieneusi</i>	USA	diarrhée chronique	diminution des CD4	selles	Wanke 1996
<i>E. bieneusi</i>	France	diarrhée	greffe coeur poumon	selles	Rabonirina 1996
<i>E. bieneusi</i>	Zambie	pas de symptômes	normal	selles	Hautvast 1997
<i>E. bieneusi</i>	Espagne	diarrhée chronique	normal	selles et biopsie duodénale	Gainzarain 1998
<i>E. bieneusi</i>	Suède	diarrhée aiguë	normal	selles	Svenungson 1998
<i>Intestinal microsporidia</i>	Thaïlande	asymptomatique	normal	selles	Mungthin 2001
<i>V. cornea</i>	USA	kératite	normal	examen histologique	Davis 1990
<i>Pleistosphora</i>	USA	myositis	Immuno-déficience cellulaire T	examen histologique	Ledford 1985
<i>Microsporidia sp</i>	USA	Kérato-conjonctivite	normal	examen histologique	Lewis 2003

Tableau IV : Cas de microsporidioses chez des patients non séropositifs, rapportés dans la littérature.

b. Patients séropositifs pour le VIH

La grande majorité des cas de microsporidioses est observée chez des patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Acquise, avec une nette prédominance pour des microsporidioses intestinales. L'utilisation des techniques de recherches d'anticorps spécifiques n'est pas efficace chez les patients VIH positifs du fait de leur état d'immunodépression induit par le virus. C'est pourquoi, les différentes études se basent, encore aujourd'hui, sur la détection directe d'organismes dans les différents liquides biologiques et biopsies. L'espèce *Enterocytozoon bieneusi* est le pathogène le plus fréquemment isolé dans les selles de patients présentant des diarrhées chroniques. Le taux de prévalence définit par différentes études est très variable. Il est de 5% pour des études dans des pays développés (Etats-Unis ou Europe) et peut atteindre 50% dans des régions moins développées économiquement. Ainsi, une étude donne un pourcentage de contamination de 17% chez des patients séropositifs souffrant de diarrhées au Cameroun (Sarfati, 2005). D'autre part, une étude menée par à New York en 1994, donne un taux de 39% de cas positifs parmi une population séropositive, souffrant de diarrhées chroniques (Kotler et Orenstein, 1994). Ces résultats sont à prendre avec précaution car les techniques diagnostiques utilisées lors des études, peuvent être responsable des variations des résultats (Weber et al., 2000; Deplazes et al., 2000).

c. Co-infections

Les co-infections avec un ou plusieurs autres entéropathogènes sont retrouvées dans 28 à 40 % des cas (Kotler, 1994; Sparfel, 1998). Les cryptosporidies et les amibes sont les plus couramment rencontrées en association avec les microsporidies. C'est pourquoi, il n'est pas toujours facile de déterminer l'étiologie exacte de la diarrhée. Les autres entéropathogènes fréquemment diagnostiqués sont des mycobactéries, des virus (cytomégalovirus, adénovirus), des bactéries (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium*) et d'autres parasites (*Isospora*).

d. Influence saisonnière

A l'inverse des cryptosporidies, plusieurs travaux (Wuhib, 1994; Sparfel, 1998; Conteas, 1998) suggèrent qu'il n'y aurait aucune influence saisonnière sur la prévalence des microsporidioses intestinales chez l'homme. Aucune différence n'est remarquée dans les pays aux saisons marquées entre la saison des pluies et la saison sèche (Conteas, 1998; Wuhib, 1994). La contamination serait due à une présence constante des microsporidies dans l'environnement plutôt qu'à une augmentation de la contamination des réserves d'eau pendant la saison des pluies ou à l'utilisation des eaux récréatives pendant l'été (Conteas, 1998).

Les taux de prévalence de microsporidioses humaines sont très différents selon les études. Ils varient en fonction de la population ciblée, la localisation de l'étude, et les méthodes diagnostiques. Cependant, le taux de prévalence apparaît nettement plus important chez les patients atteints du Virus de l'Immunodéficience Humaine. Les co-infections sont fréquentes pour les microsporidioses intestinales. Enfin, les variations climatiques saisonnières n'influencent pas les facteurs de risque de contamination.

C. Manifestations cliniques chez l'homme

1. Principales manifestations cliniques

Les microsporidies sont la cause chez l'homme d'infections à localisations anatomiques très variées : au niveau gastro-intestinal, pulmonaire, oculaire, cérébral, musculaire et des infections disséminées. Les symptômes cliniques et leur gravité varient en fonction des espèces et du statut immunitaire de l'hôte.

Le tableau V présente les plus fréquentes manifestations cliniques causées par les microsporidies humaines.

Genre	Espèces	Manifestations cliniques
<i>Enterocytozoon</i>	<i>bieneusi</i>	Diarrhée chronique rares infections disséminées, cholangite, cholécystite, pneumonie, bronchite
<i>Encephalitozoon</i>	<i>intestinalis</i>	diarrhée chronique, infections disséminées , cholangite, cholécystite, néphrite, sinusite, rhinite, bronchite, kératokonjonctivite
	<i>cuniculi</i>	hépatite, péritonite , encéphalite, sinusite, rhinite, infection intestinale
	<i>hellem</i>	Kérato-conjonctivite , pneumonie, bronchiolite, néphrite, cystite, urétrite
<i>Pleistosphora</i>	<i>species</i>	Myosite
<i>Vittaforma</i>	<i>corneae</i>	kératite , infection urinaire
<i>Trachipleistosphora</i>	<i>hominis</i>	myosite, kératoconjonctivite , sinusite, rhinite
	<i>anthropophthera</i>	encéphalite, myosite , infections disséminées
<i>Nosema</i>	<i>species</i>	kératoconjonctivite , infections disséminées

¹³Tableau V : Pathologies induites par les microsporidies humaines.

¹³ Tableau V: Center for Disease Control. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>
Pathologies induites par les microsporidies humaines, consulté en juin 2005.

Les microsporidies sont la cause chez l'homme d'infections à localisations anatomiques très variées : au niveau gastro-intestinal, pulmonaire, oculaire, cérébral, musculaire et des infections disséminées. Les symptômes cliniques et leur gravité varient en fonction des espèces et du statut immunitaire de l'hôte. Les espèces les plus fréquemment rencontrées chez l'homme, *Encephalitozoon* et *Enterocytozoon*, sont principalement responsables de diarrhées chroniques.

2. Effets cliniques liés à l'infection des genres *Enterocytozoon* et *Encephalitozoon*

a. *Enterocytozoon bienewisi*

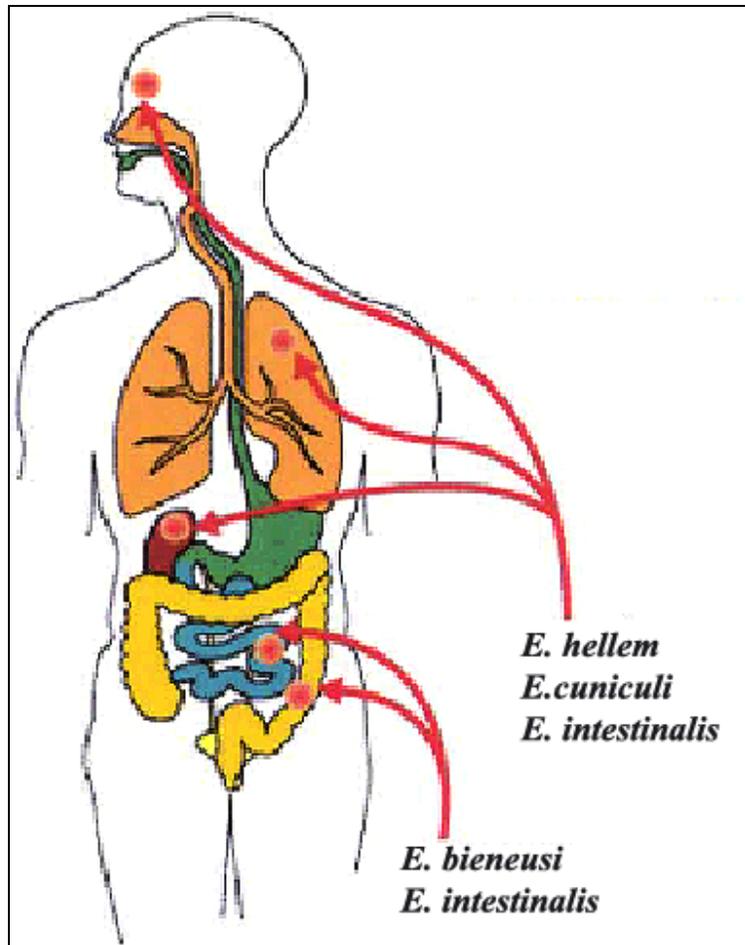
Les infections à *Enterocytozoon bienewisi* sont pour la plupart conséquentes à l'ingestion de spores. Le foyer primaire de développement infectieux se situe au niveau des cellules épithéliales aussi appelées entérocytes du duodénum et jéjunum de l'intestin grêle.

Les signes cliniques communs d'une infection par *E. bienewisi* sont des diarrhées persistantes et chroniques, des douleurs abdominales, ainsi qu'une perte de poids chez les patients immunodéprimés, tels que des patients sidéens ayant un taux de CD4 inférieur à 100 cellules T par microlitre de sang (Kotler et Orenstein, 1998). Les selles sont aqueuses ou pâteuses et émises quatre à huit fois par jour. L'appétit est généralement conservé mais la prise alimentaire aggrave les diarrhées. Dans de rares cas, *E. bienewisi* peut être responsable d'infections pulmonaires, ou encore peut toucher les canaux biliaires causant cholangite ou cholécystite. Quelques cas d'infections chez des patients immunocompétents sont rapportés dans la littérature. Ils s'agit, par exemple, de voyageurs pour lesquels l'infection à *E. bienewisi* a entraîné une diarrhée chronique d'une durée moyenne d'un mois (Sandford et al., 1994; Thielman et Guerrant, 1998; Okhuysen, 2001).

b. *Encephalitozoon intestinalis*

Pour l'espèce *E. intestinalis*, l'infection est due à l'ingestion ou l'inhalation de spores. Le foyer primaire infectieux est l'épithélium de l'intestin grêle lors d'ingestion, et l'épithélium du tractus respiratoire en cas d'inhalation de spores. Une contamination sexuelle est également possible au regard des différentes identifications de microsporidies dans l'urètre et la prostate de plusieurs patients contaminés par le VIH (Schwartz et al., 1994; Birthistle et al., 1996; Cocoran et al., 1996). De même quelques infections humaines par traumatisme ou contact direct au niveau des yeux (doigts souillés) ont été rapportées.

Une transmission foetale a été observée chez les rongeurs, carnivores, et quelques primates, mais jamais dans l'espèce humaine (Didier et al., 1998, 2000; Van Gool et al., 2004). Le symptôme clinique principal développé par l'infection à *Encephalitozoon species*, plus particulièrement *E. intestinalis*, est une diarrhée persistante. A l'inverse de *E. bienewisi*, l'espèce *Encephalitozoon* peut disséminer dans l'organisme et engendrer de plus ou moins graves infections telles que sinusites, kératoconjonctivites, encéphalites, trachéobronchites, néphrites interstitielles, ou hépatites (Kotler et Orenstein, 1998).



¹⁴ Schéma n°8 : Foyer infectieux chez l'homme des genres de microsporidies *Enterocytozoon* et *Encephalitozoon*

Les infections à *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* sont conséquentes à une ingestion de spores. De même, elles sont toutes deux responsables de diarrhées chroniques chez l'homme. Cependant l'espèce *E. intestinalis* peut contaminer son hôte par inhalation de spores, ainsi que disséminer et infecter d'autres organes (sinus, œil, encéphale, rein, foie).

¹⁴ Schéma n°8 : Centers for disease Control et Prevention, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis DPDx, laboratory Identification of parasites of Public Health Concern>, 2005.

D. Méthodes diagnostiques des microsporidioses

1. Introduction

Le diagnostic des infections à microsporidies repose sur la mise en évidence et l'identification de l'espèce du parasite dans les différents prélèvements, tissus, et substances biologiques. Il est devenu fort utile dans le cadre du suivi des patients immunodéficients, et en particulier atteints du SIDA. De plus, la distinction entre *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* doit être facile, et réalisable rapidement, du fait de l'impact clinique. En effet, *E. intestinalis* est capable de disséminer et de toucher d'autres organes que le tractus digestif. De plus, le traitement médicamenteux de ces microsporidioses est spécifique pour chacune des espèces, et l'infection doit être clairement identifiée afin de déterminer le traitement adéquat.

A l'origine, seule la microscopie électronique à transmission permettait d'affirmer le diagnostic de microsporidioses dans les tissus et fluides biologiques. L'émergence de nouvelles techniques de coloration utilisables en microscopie optique a permis de simplifier ce diagnostic. Elles sont peu coûteuses, rapides et applicables en routine, ce qui les privilégie par rapport à la microscopie électronique. Cependant, malgré les améliorations apportées à ces techniques, la détermination précise de l'espèce reste impossible. D'autres voies sont explorées, comme des cultures cellulaires ou bien des techniques immunologiques, mais sans grand succès pour le moment.

Par contre, les techniques de biologie moléculaire (amplification génique, Southern Blot, séquençage...) ont apportées depuis quelques années une aide importante au dépistage et à la différenciation des microsporidies. Elles ont été mises en œuvre pour le diagnostic en laboratoire de microsporidioses chez des animaux immunocompétents, rongeurs, lapins, et carnivores. *E. cuniculi* est l'espèce la plus communément identifiée chez ces animaux, et ces méthodes ont permis d'isoler l'organisme *E. cuniculi* sur des cultures cellulaires et d'en identifier l'antigène dès 1969 (Shadduck, 1969).

Le diagnostic différenciant des infections à microsporidies est primordial afin d'évaluer les répercussions cliniques possibles et d'adapter le traitement spécifique à l'espèce infectante. A l'origine, seule la microscopie électronique à transmission permettait d'affirmer ce diagnostic, mais l'émergence de nouvelles techniques de coloration utilisables en microscopie optique couplées aux techniques de biologie moléculaire apportent une détermination plus facile et rapide de l'espèce en cause.

2. Diagnostic des microsporidioses humaines.

a. Microscopie électronique à transmission (MET)

La MET permet de visualiser les caractéristiques ultrastructurales des microsporidies (taille, nombre de spires et de rangées du tube polaire, présence ou absence de vacuole...) dans les liquides biologiques. Elle a été très utile pour la description des spécificités ultrastructurales du développement et de la maturation de l'organisme, et pour la classification taxonomique des nouvelles espèces (Cali et Takvorian, 1999).

Appliquée à l'étude des sections de tissus, elle permet également de déterminer l'ensemble des formes prolifératives, la voie de division, la nature de l'interface hôte-parasite.

Cependant, elle n'est pas utilisée en routine pour la détection et l'identification des spores, parce qu'elle demande une bonne connaissance technique, à un coût conséquent et ce pour un résultat peu sensible.



¹⁵ Photo n°3 : Spore de *E. bienewisi* en microscopie électronique, au grossissement 1000.

Les flèches indiquent l'enroulement double du tube polaire caractéristique de l'espèce.

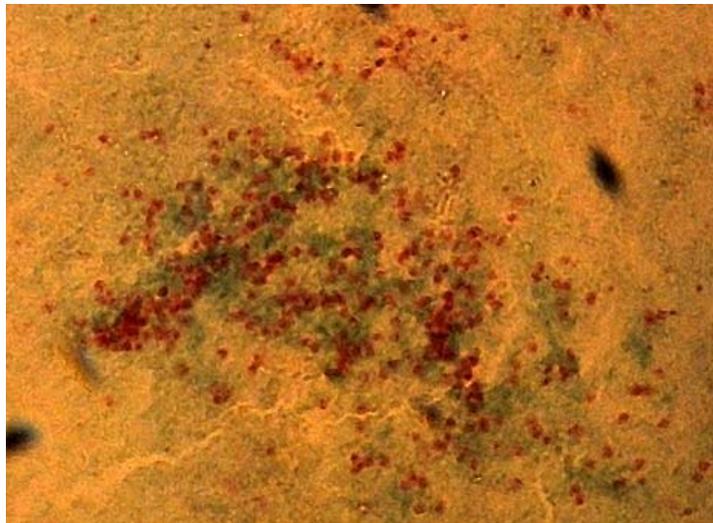
¹⁵ Photo n°3: Center for Disease Control. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>, Spore de *E. bienewisi* en microscopie électronique, consulté le 3 mai 2005.

b. Microscopie optique

L'amélioration des colorations (meilleure sensibilité et spécificité) et l'utilisation d'un microscope optique permettent de disposer de techniques simples et facilement utilisables en routine pour la reconnaissance des spores de microsporidies. Malgré tout, elles ne permettent pas l'identification de l'espèce. Différentes colorations sont disponibles :

- Coloration de Giemsa et de Gram

Elles sont simples, rapides et ont été les premières employées, mais ne permettent pas une très bonne discrimination entre les spores de microsporidies et d'autres éléments présents dans les selles et autres liquides biologiques. Une étape de concentration préalable est souvent nécessaire. Elles ne sont pratiquement plus utilisées actuellement.



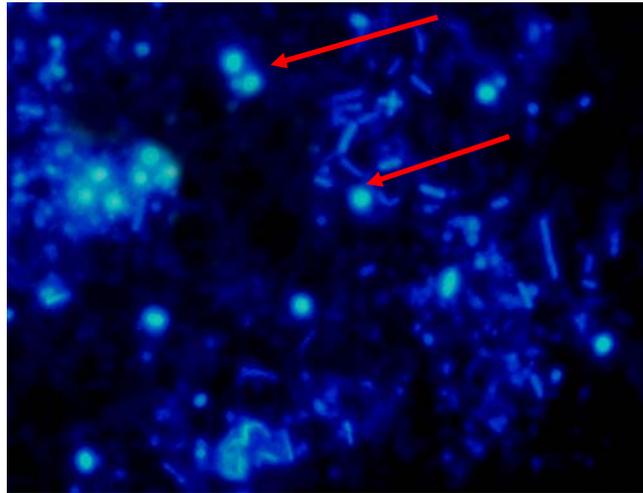
¹⁶Photo n°4 : Spores d'*Enterocytozoon bienewisi* colorées par la méthode Giemsa au grossissement 1000.

¹⁶ Photo n°4: Photo de spores d' *Enterocytozoon bienewisi* colorées par la méthode de Giemsa, collection du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes

- Coloration à base d'agents chimiofluorescents

Elles constituent le deuxième grand groupe de méthodes de coloration. Elles sont rapides mais nécessitent l'utilisation d'un microscope à fluorescence. Les actifs chimiques appelés fluorochromes se lient à la chitine de l'endospore. Excitées par la lumière ultraviolette de la lampe, les spores apparaissent fluorescentes. Elles sont identifiées par leur taille, leur forme, l'aspect et la couleur de la fluorescence. Différents réactifs sont proposés : Uvitex 2B, UVIBIO, Calcifluor White, Fungifluc. La technique la plus employée est celle de Van Gool (1993), qui utilise l'Uvitex 2 B (annexe 4). Les spores apparaissent en vert-bleu brillant sur fond noir. Une fluorescence atténuée peut indiquer la présence de formes plus immatures ou de formes altérées.

Cette méthode qui semble simple doit être finalisée par des lecteurs entraînés. En effet, la **coloration n'étant pas spécifique**, des levures, des bactéries et des petits résidus peuvent, eux aussi, être fluorescents et donc confondus avec des spores de microsporidies (Didier, 1995). Un lecteur entraîné fait la différence principalement par la taille et la forme ronde à ovalaire des spores.



¹⁷ Photo n°5 : Photo de spores d' *E. bienewisi* au microscope à fluorescence, filtre 365 nm, au grossissement 1000.

¹⁷ Photo n°5 : Photo numérique de spores d'*E. bienewisi* au microscope à fluorescence, filtre 365 nm, collection du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes.

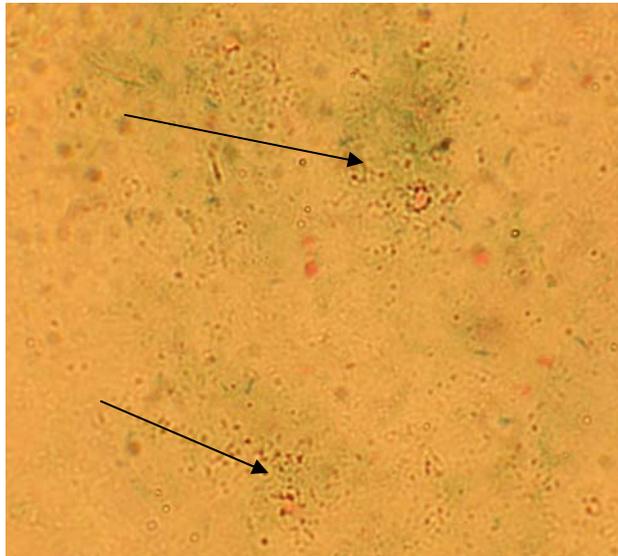
- Coloration à base de trichrome

La technique de Weber (annexe 5) est actuellement la meilleure technique colorimétrique et la plus employée. Elle dérive du trichrome classique de Wheatley mais avec une concentration dix fois supérieure de chromatrope 2R. Cette modification a considérablement amélioré la détection des spores. On commence à voir apparaître une morphologie. La spore prend une couleur caractéristique de rose-rouge brillant présentant, en fixant l'attention du regard sur la spore, une vacuole transparente et un point rouge vif situé à l'opposé de cette vacuole, le tout reposant sur un fond vert.

Malgré ces caractéristiques précises, les spores sont difficiles à détecter surtout si l'échantillon est pauvre (Franzen, 1999). En effet, c'est technique beaucoup plus spécifique et précise que l'Uvitex 2B, mais moins sensible.

Des modifications ont été apportées à la technique de Weber afin d'améliorer le contraste entre les spores et le fond de la lame, et de diminuer le temps de coloration :

- modification des températures et raccourcissement des temps d'incubation (Kokoskin, 1994)
- diminution du taux d'acide phosphotungsténique et remplacement du vert brillant par de l'aniline (Ryan, 1993)
- modification des concentrations relatives des trois composants et ajout d'une étape supplémentaire de contre-coloration par du vert malachite (Deluol, 1994)



¹⁸ Photo n°6 : Photo numérique en microscopie optique de spores d'*E. bienesi* colorées par la méthode de Weber modifiée, au grossissement 1000.

¹⁸ Photo n°6 : Spores d' *Enterocytozoon bienesi* colorées par la méthode de trichrome de Weber, collection personnelle.

Sparfel, dans le cadre de sa thèse en 1996, a réalisé une étude dans le but d'optimiser le diagnostic parasitologique des microsporidies intestinales humaines. Il a comparé l'efficacité de cinq colorations : l'Uvitex 2B et 4 trichromes, l'un de Weber, et trois autres variantes proposés par Ryan, Kokoskin et Deluol . Son étude met en évidence la nécessité de coupler deux de ces techniques colorimétriques pour obtenir une bonne spécificité à travers le trichrome de Weber, et une bonne sensibilité par l'Uvitex 2B ou Uvibio (Sparfel et al.,1997).

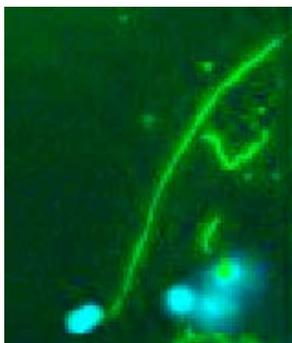
- Autres colorations colorimétriques

En complément de ces colorations, d'autres méthodes ont été décrites. Ainsi, il existe une coloration au Trichrome Acid Fast, dont l'avantage majeur est une mise en évidence simultanée des microsporidies et des cryptosporidies, autre parasite responsable de diarrhées chroniques (Garcia, 1994; Ignatius, 1997) . Cette coloration est facile, peu coûteuse et rapide. Il existe encore le Quick Hot Gram Chromotrope, qui a une bonne spécificité vis à vis des microsporidies (Moura, 1997).

- Méthode antigénique

Une autre méthode de détection de microsporidies repose sur une recherche antigénique, par différentes techniques ELISA, Western Blot ou par fixation d'Anticorps fluorescents. On dispose, actuellement, d'antisérums spécifiques d'*Encephalitozoon intestinalis* obtenus à partir de cultures. Cependant *Enterocytozoon bienewisi* ne pouvant être cultivé, l'obtention d'antisérums spécifiques vis à vis de ce parasite s'avère beaucoup plus difficile.

L'immunofluorescence (photo n°7), utilisée dans la recherche d'*Encephalitozoon intestinalis*, fait apparaître les spores en fluorescence verte (Ledford, 1985; Didier, 1995; Sobottka, 1995; Zierdt et Gill, 1993).



¹⁹ Photo n°7 : Photo de spores de *E. intestinalis* identifiées par méthode antigénique.

- Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire des microsporidies est basé sur l'identification de l'ARN ribosomique contenu dans la spore.

La méthode de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction), est de loin la plus sensible et la plus spécifique. Elle permet de distinguer des espèces aussi proches que *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi* et *Encephalitozoon intestinalis*. Elle nécessite une extraction préalable de l'ARN, par effraction des membranes de la spore par ébullition, et digestion par des protéinase K, lyticase, et chitinase ou par l'utilisation de kits complets commerciaux.

¹⁹ Photo n°7: Center of Disease Control. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>.
Photo de spores de *E. intestinalis* identifiées par méthode antigénique, consulté le 3 mai 2005.

Les travaux de Vossbrinck sur *Vairimorpha necatrix* dès 1986 ont permis de décrire l'ARNr des microsporidies par comparaison à celui des cellules eucaryotes. Ils sont formés par une petite sous unité (SSUr RNA) de 16S, une grande sous unité (LSUr RNA) de 23 S, séparées par l'ITS (Intergenic Transcribed Spaces) (Vossbrinck, 1987). Les microsporidies ne possèdent pas d'ARNr 5.8S comme les autres eucaryotes, mais la région 5' de LSUr RNA correspond en partie à l'ARNr 5.8 S. Les gènes codants pour SSU et LSUr RNA sont également plus courts chez les microsporidies que chez les eucaryotes. (Vossbrinck, 1987; 1996).

Consécutivement à la description de la séquence du gène codant pour la petite sous unité de l'ARNr de *V. Necatrix* par Vossbrinck en 1987, les séquences codantes pour la petite sous unité de l'ARNr de plusieurs autres microsporidies pathogènes pour les hommes ont pu être amplifiées et séquencées en utilisant des primers complémentaires des séquences conservées de *V. Necatrix* (Vossbrinck, 1987;1996; Zhu,1993; Hartskeerl 1993). De nombreux primers ont été décrits et utilisés par la suite pour amplifier des fragments des gènes de l'ARNr de différentes microsporidies. La majorité d'entre eux sont complémentaires de séquences se situant dans la région codantes pour la petite sous unité de l'ARNr. Il existe aujourd'hui, à la fois des primers génériques qui permettent l'amplification de plusieurs espèces de microsporidies, et des primers spécifiques à chaque espèce.

Le tableau VI suivant présente quelques paires de primers utilisés dans le diagnostic de microsporidioses humaines.

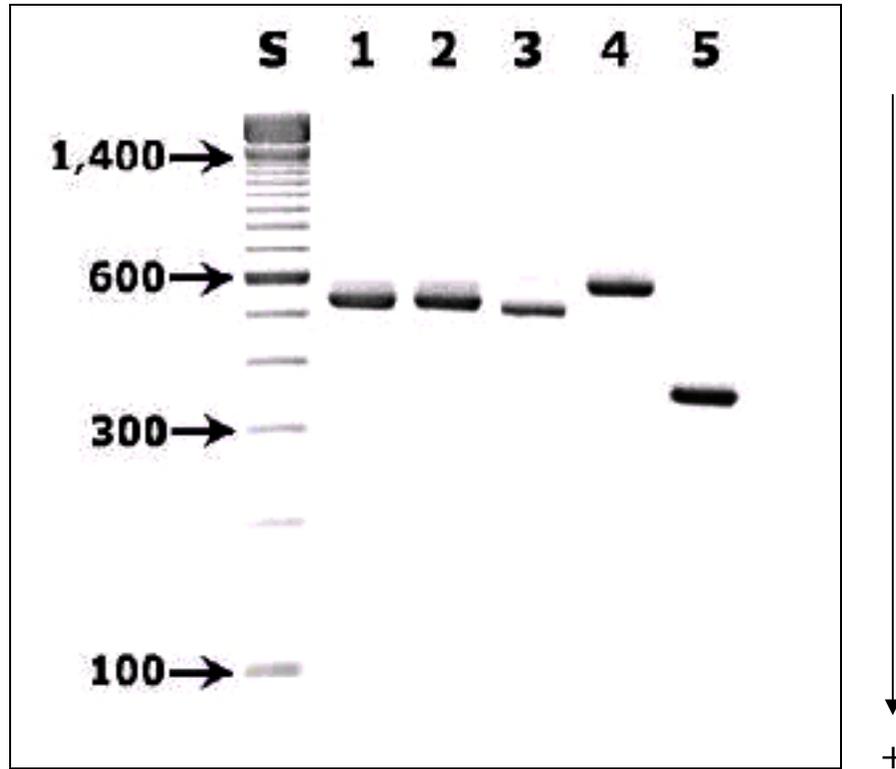
SSU-rRNA PCR primer paires pour le diagnostic d'infection à microsporidies						
Sondes (no. nucléotides)	Nom	Organisme amplifié	Taille pb	Source	Références	
5'CACCAGGTTGA TTCTGCCTGAC-3'	Didier 1993	V1	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	348	Biopsie de tissu duodéal	Zhu, 1993, Franzen,1995 Weiss, 1994
5'ACTCAGGTGTT ATACTCACGTC-3'	Didier 1993	EB450	<i>Encephalitozoon hellem</i>		Culture d'organisme	Zhu, 1993
5'GAAACTTGTC ACTCCTTACG-3'	Hollister 1991	EBIEF 1	<i>E.bieneusi</i>	607	Bile	Da Silva, 1996
5'CCATGCACCAC TCCTGCCATT-3'	Hollister 1991	EBIER 1			Aspiration duodénale	
5'TGAGAAGTAAG ATGTTTAGCA-3'	Hollister 1991		<i>E.hellem</i>	547	Culture d'organisme	Visvesvara, 1994
5'GTAAAAACACT CTCACACTCA-3'	Hollister 1991					
5'ATGAGAAGTGA TGTGTGTGCG-3'	Hollister 1991		<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	549	Culture d'organisme	Visvesvara, 1994 De Grote, 1995
5'TGCCATGCACT CACAGGCATC-3'	Hollister 1991					
5'CACCAGGTTGA TTCTGCCTGAC-3'	Didier 1993	V1	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	370	Biopsie tissu	Weiss, 1994
5'CTCGCTCCTTT ACACTCGAA-3'	Van Gool, 1994	SI500				
5'CACCAGGTTGA TTCTGCCTGAC-3'	Didier 1993	PMP1*	<i>E.bieneusi</i>	250	Selles	Fedorko, 1995
5'CCTCTCCGAA CCAAACCTG-3'	Hollister 1991	PMP2	<i>E.cuniculi</i>	268	Culture d'organismes	
			<i>E.intestinalis</i>	270	Selles	
			<i>E.hellem</i>	279	Culture d'organisme	

*la séquence nucléotidique du primer PMP1 est identique à celle du primer V1.

²⁰ Tableau n°VI : Séquences de primers pour le diagnostic de microsporidioses humaines.

²⁰ Tableau n°VI : Revue "Emerging Infectious Disease". Séquences de primers spécifiques pour le diagnostic de quelques microsporidioses humaines. Vol 2 n° 3 sept 1996.

Le schéma n°9 présente les bandes diagnostiques de microsporidies amplifiées à l'aide des primers spécifiques PCR et révélées sur un gel d'agarose à 2%(²¹).



- **Ligne S:** Standard (100-bp ladder). Les traces noires montrent la taille (en pb) des différents standards moléculaires.
- **Ligne 1:** Spécimen positif d'*Encephalitozoon cuniculi* amplifié par les primers PCR ECUNF/ECUNR, taille de la bande: 549 pb.
- **Ligne 2:** *Encephalitozoon hellem* amplifié par PCR primers EHELF/EHELRL, taille de la bande: 547 pb.
- **Ligne 3:** *Encephalitozoon intestinalis* amplifié par PCR primers SINTF1/SINTR, taille de la bande: 528 pb.
- **Ligne 4:** *Enterocytozoon bieneusi* amplifié par PCR primers EBIEF1/EBIER1, taille de la bande: 607pb.
- **Ligne 5:** *Vittaforma cornae* amplifié par PCR primers NCORF1/NCORR1, taille de la bande : 375 pb.

²¹ Schéma n°9 : Center of Disease control. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>
Bandes diagnostiques de microsporidies humaines amplifiées par des primers spécifiques PCR et révélées sur un gel d'agarose à 2 %, consulté en Juin 2005

La PCR, outil essentiel à de nombreuses études diagnostiques et épidémiologiques, s'est avérée bien adaptée à l'identification de microsporidies. Cette technique est rapide, relativement simple et beaucoup moins lourde que la microscopie optique et électronique à transmission. Les comparaisons effectuées par les différentes équipes développant la technique de PCR, montrent des performances égales voire supérieures pour la PCR en ce qui concerne la sensibilité et la spécificité que la microscopie optique et à transmission (Liguory, 1997; Katzwinkel, 1997; Carville, 1997; Da Silva, 1997; Ombrouck, 1997), à condition que l'étape d'extraction de l'ARN ribosomique soit réalisée dans de bonnes conditions.

Différentes méthodes existent pour le diagnostic de microsporidies humaines, notamment à *E. bienewisi* et *E. intestinalis*. La Microscopie Electronique à Transmission permet de visualiser les caractéristiques ultrastructurales des microsporidies, pourtant elle est peu utilisée en routine car elle nécessite une bonne connaissance technique, à un coût conséquent, et donne un résultat peu sensible. D'autre part, les améliorations données aux techniques de microscopie optique (Giemsa, agents fluorescents, trichrome) permettent de disposer d'outils simples et facilement utilisables en routine pour la détection de spores de microsporidies ; cependant l'identification de l'espèce est impossible avec ces techniques. C'est pourquoi, les laboratoires actuels ont adapté et appliqué les techniques de biologie moléculaire (PCR) pour l'identification de l'ARN ribosomique des microsporidies, afin d'accéder à une méthode de diagnostic simple, rapide, sensible et spécifique.

En résumé, le tableau suivant présente les différentes techniques diagnostiques d'*Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* et leur niveau de spécificité et de sensibilité.

<i>Techniques</i>			<i>Sensibilité</i>	<i>Spécificité</i>	<i>Caractéristiques</i>
	électronique		+	+++++	Identification basée sur l'ultrastructure. Diagnostic différentiel entre <i>E. intestinalis</i> et <i>E. bienewisi</i> d'après la présence d'une membrane septée (<i>E. intestinalis</i>)
	optique	colorations classiques	+	+	Pas suffisamment performantes
		Bleu Trichrome simple	++	++	Méthode facile, rapide et plus performante que les colorations classiques
		Trichrome modifié de Weber	++	+++	Modifications des concentrations des composants du trichrome simple, offrant une meilleure spécificité. Intérêt de l'associer aux fluorochromes
		Fluorochromes	+++	++	Nécessité d'un microscope à fluorescence
		Trichrome Acid Fast	?	?	Détection simultanée des microsporidies et de <i>Cryptosporidium parvum</i>
		Quick Hot Gram Chromotrope	?	?	Coloration violette des spores de microsporidies
Recherche d'antigènes (immuno-fluorescence)	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>		++	+++	Sérum spécifique. Fluorescence verte
	<i>Enterocytozoon bienewisi</i>		+++	++	Pas de sérum spécifique. Mise en évidence par réaction croisée
PCR			+++++	+++++	Séquences spécifiques des microsporidies et également séquences permettant le diagnostic différentiel entre <i>E. bienewisi</i> et <i>E. intestinalis</i> . Problème de l'application en routine

Tableau VII : comparaison de méthodes diagnostiques pour les espèces *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis*

E. Traitements des microsporidioses humaines

1. Introduction

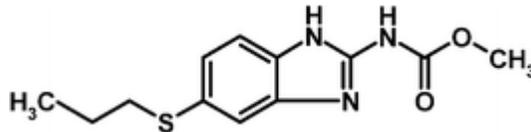
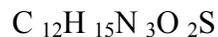
La littérature présente de nombreuses études thérapeutiques concernant plusieurs types de molécules, mais la réussite des traitements des microsporidioses humaines est encore limitée. Actuellement, les deux molécules les plus utilisées dans le traitement des microsporidioses humaines et animales sont l'albendazole et la fumagilline. L'espèce *Enterocytozoon bieneusi*, pourtant la plus fréquente, est la plus difficile à traiter. En effet, elle se différencie des principales autres espèces de microsporidies chez l'homme par son mode de développement et de multiplication à l'intérieur même du cytoplasme de la cellule hôte, sans vacuole parasitophore. Cette vacuole apparaît être une cible possible du traitement des microsporidioses.

2. Les molécules

a. L'albendazole

L'albendazole est un dérivé du benzimidazole et agit par liaison à la β tubuline des microsporidies, inhibant ainsi la polymérisation et la division du pathogène (Didier, 2005). Il possède d'autres indications, pour les infections à *Taenia solium*, *Trichinella spiralis*, et *Strongyloides stercoralis*. La toxicité de l'albendazole est généralement faible. Cependant, dans le cas d'une intoxication aiguë, des symptômes tels que perte de poids, convulsions, diarrhées, et problèmes respiratoires peuvent apparaître. Comme les autres benzimidazoles, l'albendazole est tératogène aux doses thérapeutiques. Un mauvais fonctionnement du système hématopoïétique et du foie sont les signes d'une intoxication chronique.

- *Formule chimique :*



5-(Propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl)carbamic acid methyl ester

- *Noms commerciaux :*

ESKAZOLE 400mg

ZENTEL 400 mg

b) Fumagilline

La fumagilline est un antibiotique, de la classe des macrolides, dérivé du champignon *Aspergillus fumigatus*, actif *in vivo* sur la microsporidiose des abeilles et *in vitro* sur les spores d'*Enterocytozoon bieneusi*. Chez l'homme, la fumagilline a été utilisée pendant plus de quarante ans pour traiter l'amibiase intestinale et est encore aujourd'hui prescrite en topique local pour la kératoconjonctivite à microsporidies à *E. hellem*.

La fumagilline et son dérivé synthétique, le TNP-470, inhibent la multiplication de microsporidies, et sont aussi actifs sur certaines tumeurs. Le TNP-470 est inscrit dans la thérapeutique clinique des cancers, comme agent anticancéreux. Récemment, Molina a montré que la fumagilline et son dérivé synthétique, administré par voie orale, avait une efficacité prouvée sur *Enterocytozoon bieneusi* (Molina, 2000).

Une étude « ANRS 090 », menée en 2002, conjointement par des équipes de l'hôpital Saint-Louis et du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière (Paris), a inclus douze patients (dix sida et deux transplantés) dans une étude contrôlée randomisée en double aveugle. Elle était destinée à confirmer l'efficacité de l'antibiotique sur les microsporidies. Les critères d'inclusion sont stricts (d'où le petit nombre de candidats inclus) : patient immunodéprimé infecté par le VIH ou transplanté, porteur d'une microsporidiose intestinale prouvée par la présence de spores dans deux examens de selles durant les quinze jours précédant l'étude, ainsi que n'ayant pas eu de modification du traitement antirétroviral ou immunosuppresseur dans les deux mois précédents. Après randomisation, six patients ont reçu durant quinze jours la fumagilline (20 mg, 3/j, à jeun) fournie par le laboratoire Sanofi Synthélabo et six autres un placebo. Quinze jours après la fin de l'étude, les patients toujours porteurs de microsporidies dans les selles ont reçu en ouvert le traitement actif à la même dose durant deux semaines. Les patients chez qui les spores n'étaient plus retrouvées étaient ensuite suivis mensuellement jusqu'à la survenue d'une rechute parasitologique. A l'issue des 15 jours d'étude contrôlée (période durant laquelle aucun sujet n'est sorti du protocole), tous les

patients traités par fumagilline n'avaient plus de spores d'*E. bienersi* dans les selles, alors que ceux sous placebo en étaient toujours porteurs (100 % vs). Durant la phase de suivi, le taux de récurrence à 40 jours était de 16,7 %. Malgré ces bons résultats, les investigateurs ont constaté des effets indésirables graves liés à une atteinte sévère des lignées hématopoïétiques (thrombopénie, leucopénie), atteinte régressive dans les deux semaines suivant l'arrêt du traitement (4 en phase contrôlée et 7 en phase ouverte). En conclusion, la fumagilline est un traitement efficace contre les microsporidies intestinales dont l'utilisation ne peut pas être envisagée en l'absence de surveillance hématologique stricte (tous les deux jours).

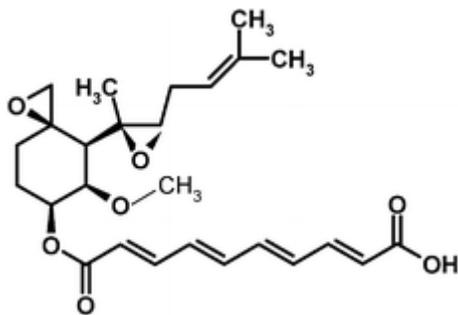
Le mécanisme d'action de la fumagilline sur les spores de microsporidies demeure inconnu.

- *Formule chimique:*



2,4,6,8-Decatetraenedioic acid

4-(1,2-Epoxy-1,5-diméthyl-4-hexenyl)-5-méthoxy-1-oxaspiro[2.5]oct-6-yl ester



L'analogue de la fumagilline TNP-470 est le O-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol.

- *Noms commerciaux:*

FUMIDIL B®, Abbott

TNP-470®, Takeda Chemical Industrie

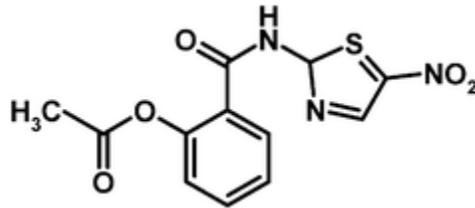
c) Le Nitazoxide

Le nitazoxide est une molécule à action antiparasitaire utilisée pour le traitement de diarrhées parasitaires, à *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Blastocystis hominis*, *Balantidium coli*, *Helicobacter pilori*, *Clostridium perfringens* et différents helminthes. Des études ont rapporté son efficacité clinique sur *Enterocytozoon bienewisi* (Bicart See, 2000), mais son efficacité à long terme n'est pas démontrée. La cible thérapeutique de cette molécule semble être les enzymes du système anaérobie de transport des électrons au niveau de l'organisme parasite.

- *Formule chimique:*



2-(Acetyloxy)-N-(5-nitro-2-thiazolyl)-benzamide



d) Les traitements antiviraux

Ils ne semblent pas influencer les microsporidies par effet direct. Par contre, l'utilisation d'une thérapeutique antirétrovirale puissante, associée ou non à une antiprotéase permet une régression des épisodes diarrhéiques, un arrêt de l'amaigrissement, voir une reprise de poids et dans certains cas une disparition des spores dans les selles ou les biopsies (Foundraïne, 1998; Conteas, 1998)

Actuellement, les deux molécules les plus utilisées dans le traitement des microsporidies humaines et animales sont l'albendazole et la fumagilline. La fumagilline et son dérivé synthétique TNP 470, au contraire de l'albendazole, sont actifs sur *E. bienersi*, mais présentent des effets secondaires hématotoxiques. Leur utilisation ne peut pas être envisagée en l'absence de surveillance hématologique stricte (tous les deux jours).

3. Schéma thérapeutique

Le traitement de choix pour les infections oculaires à microsporidies (*Brachiola algerae*, *Encephalitozoon hellem*, *E. cuniculi*, *Vittaforma corneae*) est l'albendazole par voie orale, plus la fumagilline en topique. Les infections de cornée à *V. cornea* ne répondent pas bien à la chimiothérapie et requièrent une kératoplastie. La fumagilline par voie orale est efficace pour le traitement de microsporidioses à *Enterocytozoon bieneusi*, mais elle est responsable de thrombocytopénie, ce qui limite son utilisation. L'albendazole est la molécule de référence pour traiter les infections intestinales causées par *Encephalitozoon intestinalis*, les infections disséminées à *Encephalitozoon hellem*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *Pleistosphora sp.*, *Trachipleistophora sp.*, *Brachiola vesicularum*, ainsi que les infections musculaires à *Brachiola algerae*.

– **Infections oculaires :**

Encephalitozoon hellem,
Encephalitozoon cuniculi,
Vittaforma corneae



Albendazole 7 400 mg/j
plus fumagilline en topique

– **Infections disséminées :**

E. hellem, *E. cuniculi*, *E. intestinalis*,
Pleistosphora sp., *Trachipleistosphora sp.*
et *Brachiola vesicularum*



Albendazole 7400 mg/jour

– **Infections intestinales :** *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*

- *E. bieneusi* → Fumagilline 60 mg/dose per os pendant 14 jours.
- *E. intestinalis* → Albendazole 7400 mg/dose pendant 21 jours

La fumagilline par voie orale est le seul traitement efficace sur les microsporidioses à *E. bieneusi*, mais elle est responsable de thrombocytopénie, ce qui limite son utilisation. L'albendazole est la molécule de référence pour traiter les infections causées par *E. intestinalis*.



Base 800471 (546744) 12-85

A. Cadre de l'étude

1. cadre socio-géographique

Notre étude sur la recherche de microsporidies intestinales humaines a été réalisée à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie, en République socialiste du Vietnam, et plus précisément à Hanoi, sa capitale.

a. Parasite méconnu

Les microsporidies sont une classe de parasites ubiquitaires, mais aucun article n'a été publié relatant leur présence au Vietnam. De plus, les scientifiques de l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie ne connaissent pas cette classe de parasite, aussi le travail prioritaire au début de ce stage a été de présenter et d'informer l'équipe des caractéristiques, de la pathogénie et des risques sanitaires liés à l'étude et à la recherche des microsporidies intestinales chez l'homme.

b. Partenaires

- Partenaires scientifiques

Une collaboration scientifique et amicale lie depuis une dizaine d'années le service de parasitologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes et l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoi. Précédemment à notre étude sur les microsporidies, différentes études conjointes ont été réalisées sur les cycloporoses à *Cyclospora cayetanensis* (seule espèce pathogène chez l'homme), ou encore sur *Penicillium marneffei*. Les laboratoires de l'Institut sont très correctement équipés et le personnel du service de parasitologie, dirigé par le professeur Phung Dac Cam, est compétent.

La photo n°8 suivante présente l'entrée de l'Institut²².



²²Photo n°8 : Photo de l'entrée de l'institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie, collection personnelle, juillet 2005.

La photo n°9 suivante présente le laboratoire du professeur Cam, où a été réalisée notre étude, et deux de ses techniciennes²³.



- Partenaires financiers

Notre projet a reçu peu de financement. Le financement principal a été pris en charge par l'hôpital de Nantes. Une aide complémentaire a été apportée par la compagnie de microscopie allemande Zeiss. De même, le laboratoire Fumouze, nous a fourni des kits de diagnostic aspergilloses, et candidoses que nous avons mis à disposition du laboratoire du Professeur Phung Dac Cam, ainsi qu'un petit apport financier. Enfin, l'entreprise européenne Abbott a permis l'obtention de 400 tests bio analyse Determine® VIH-1/VIH-2. Ces tests ont été mis à la disposition des différents hôpitaux pour le diagnostic du VIH sur le terrain.

Le projet, débuté en octobre 2004, a été réalisé à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie à Hanoi au Vietnam et en collaboration avec le laboratoire de parasitologie de l'hôpital de Nantes. Les laboratoires Zeiss, Fumouze, et Abbott ont apporté un soutien financier et matériel à la mise en place du projet.

²³ Photo n°9 : Photo du laboratoire et de deux techniciennes du service de parasitologie de l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie à Hanoi, collection personnelle, juin 2005.

2. Pays en voie de développement

a. Fiche pays comparée Vietnam France

Nom officiel	République Socialiste du Vietnam	République Française
Capitale	Hanoi	Paris
Superficie	332 000 km ²	543 964 km ²
Nombre d'habitants	81 098 000 habitants	59 900 268 habitants
Densité	248 hab./km ²	110.11 hab. /Km ²
Population urbaine	26 % (2003)	75,5 % (2004)
Produit Intérieur Brut	480 dollars par hab. (2004)	240 386 dollars par hab. (2004)
Espérance de vie	69 ans (2003)	73,9 ans (2004)
Taux de mortalité infantile pour 1000	23 (2002) inférieure à 5 ans	4,3 à la naissance (2002)
Taux d'alphabétisation	90 % 87 %femmes, 94 %hommes	100 %
Indicateur de développement humain	112 ^{ème} sur 177 pays (2002)	16 ^{ème} sur 177 pays (2002)
Population utilisant des ressources d'eau potables	73 % 93 % urbaine 67 % rurale	100%
Accroissement de la population entre 2003 et 2004 (fonction des naissances/décès et migration)	1 475 000 pers	386 000 pers

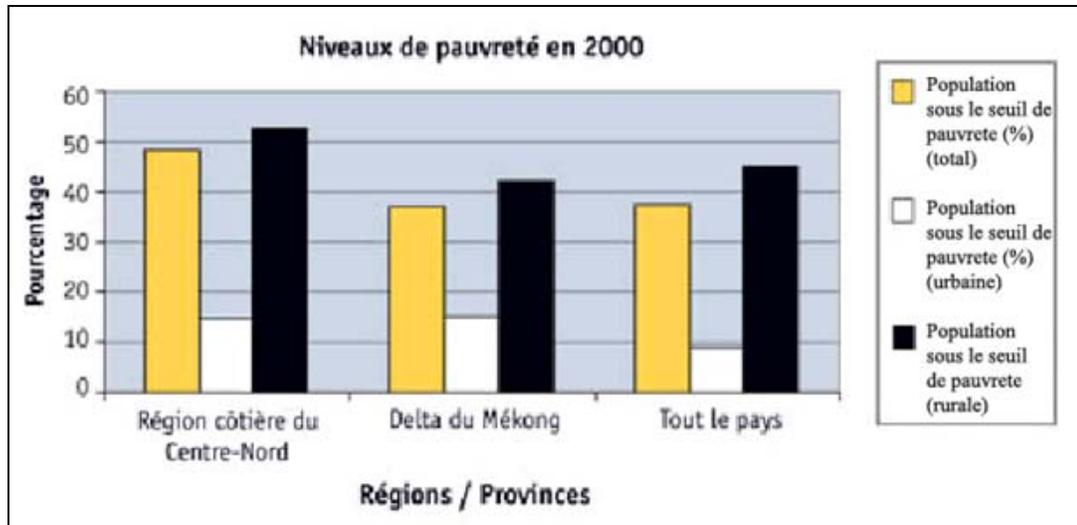
b. Un pays en évolution rapide

Le Vietnam est un pays en voie de développement de l'Asie du Sud Est, confronté à des difficultés socio-économiques majeures.

En 1986, le gouvernement a entrepris un projet de réforme économique dont l'objectif était d'effectuer la transition d'une économie centralisée à une économie de marché. Le pays a accompli de lourds progrès en atteignant un taux de croissance annuel moyen supérieur à 8 % dans les années 90, et on estime que la pauvreté a chuté de 35 % depuis 1986. Le revenu par habitant a également augmenté, passant de 115 \$US en 1990 à 480 \$US en 2004. La redistribution des terres qui a suivi la décollectivatisation à la fin des années 1980 a entraîné une augmentation des revenus agricoles et transformé le Vietnam en l'un des plus grands exportateurs de riz au monde (rapport annuel ambassade du Canada, 2004).

Toutefois, malgré ces progrès, il reste encore de nombreux défis à relever : la moitié des enfants âgés de moins de six ans souffrent de malnutrition. De même à peine plus d'un tiers de la population a accès à de l'eau potable chez elle.

Le graphique n°1 suivant présente le niveau de pauvreté de la population vietnamienne en 2000, ²⁴.



²⁴ Graphique n°1 : Graphique relatant le niveau de pauvreté de la population vietnamienne en 2000, ambassade du Canada, 2005.

Le Vietnam demeure l'un des pays les plus pauvres du monde, plus particulièrement chez les minorités ethniques et dans les régions rurales éloignées (régions côtières du centre Nord et delta du Mékong).

Les photos suivantes présentent une enfant Hmong noire et sa maison dans la région de Sapa ²⁵.



Photo n°10

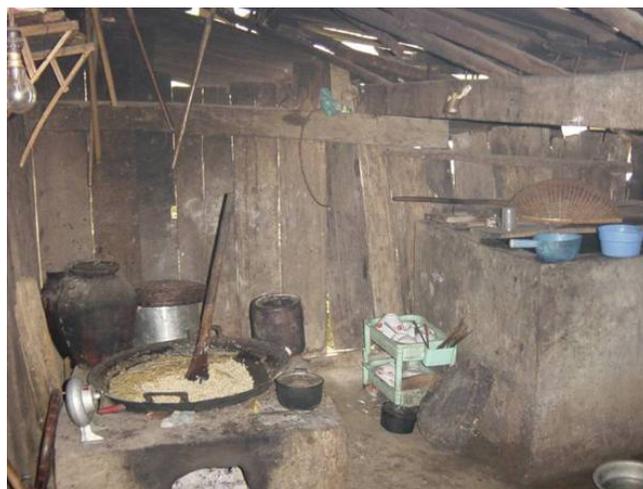


Photo n° 11

²⁵ Photo n°10 et 11 : Photo d'une enfant de la minorité des Hmongs noirs, et d'une maison Hmong Noir dans la région nord du Vietnam, collection personnelle, Mai 2005

c. Situation de l'épidémie de SIDA

- Aperçu de la situation

Au 31 décembre 2003, le taux de prévalence de l'épidémie de SIDA au Vietnam était de 0.29 %. Ce chiffre est une estimation faite à partir du taux "officiel". En effet, le diagnostic du VIH n'étant pas systématique, il est souvent établi par l'intermédiaire des infections opportunistes, au stade SIDA déclaré. Les populations officiellement les plus touchées sont les femmes enceintes et les candidats militaires, dépistés systématiquement. Cette situation laisse craindre une forte prévalence dans la population générale. Les 15-49 ans représentent 95 % des contaminés; et le taux de prévalence chez les 20-29 ans est passé de 15 % en 1993 à 62 % fin 2002. ONUSIDA estime que 1 million de personnes seront séropositives au Vietnam en 2010.

Le principal mode de transmission décrit concerne les usagers de drogues intraveineuses (prévalence de 50 à 70 % dans ce groupe), qui représentent 61% des cas cumulés de Sida. Plus récemment, l'épidémie se développe chez les prostituées (*sex workers*), en particulier dans les régions du Sud.

- Prise de conscience internationale

En juin 2004, le gouvernement des Etats Unis a pris la décision d'intégrer le Vietnam dans la liste des pays nécessitant un plan d'urgence pour contrôler l'épidémie de SIDA. Cette liste comprend 13 pays d'Afrique, et un seul pays d'Asie du Sud Est, le Vietnam.

De même, le directeur de la banque mondiale vient de signer, le 26 mai 2005, une aide de 35 millions de dollars au ministère de la santé vietnamien afin de financer un programme de prévention national face à l'épidémie.

Enfin, différentes Organisations Non Gouvernementales comme la Croix Rouge, ou encore le programme français ESTHER (Ensemble pour une Solidarité Thérapeutique en Réseau) participent à cette prise de conscience et à la mise en oeuvre de programme d'information, de prévention, de prise en charge des

patients, de traitements et de réduction de la discrimination des personnes vivant avec le VIH au sein de la population vietnamienne.

- Prise en charge thérapeutique

Les organisations commencent, depuis 2004, à mettre en place des programmes de trithérapies pour les malades. Mais, actuellement, très peu de malades en bénéficient. Leur état d'immunosuppression sévère les expose à des risques importants de contamination pour les maladies opportunistes, dont font partie les microsporidies.

La photo n°12 suivante présente un enfant de 6 mois, du centre de Ba Vi à l'Est de Hanoi, contaminé par transmission fœtale du virus du SIDA²⁶. Son développement intellectuel et moteur est limité par le virus et à terme, l'enfant sans traitement risque de développer des infections opportunistes.



Le Vietnam, depuis les années 90, est un pays en expansion démographique et économique. Cependant, ce changement est à deux vitesses. Les zones urbaines sont en pleine explosion économique et le mode de vie de la population évolue considérablement. A l'opposée, les zones rurales restent pauvres et leurs conditions de vie évoluent très peu. De plus, l'épidémie du Sida étant incontrôlée, cette situation instable laisse place à des risques sanitaires et épidémiques importants.

²⁶ Photo n°12 : Photo d'un enfant contaminé et d'une soignante du centre d'accueil aux patients sidéens de Ba Vi au Nord Est de Hanoi, collection personnelle, février 2005.

3. Objectifs

a. Objectifs initiaux

Notre étude, à son début, était destinée à établir **la prévalence des microsporidioses dans la population de patients VIH positif au Vietnam**, mais elle a présenté dès sa mise en place à l'INHE (Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie), quelques difficultés. En effet, nous n'avions pas pris en compte la méconnaissance totale des microsporidioses au Vietnam, ainsi que la situation non contrôlée de l'épidémie du Sida au Vietnam. Cette dernière caractéristique met en doute la fiabilité des informations des patients, réduit en nombre la population ciblée, expose au risque de surestimer la prévalence chez la population VIH compte tenu du fait que les échantillons reçus proviennent tous de patients au stade SIDA déclaré.

b. Objectifs réévalués

Suite à la mission du Docteur Miegville à l'INHE, fin octobre 2004, nous avons réévalué les démarches de l'étude. Ainsi les objectifs ont été répartis en trois principaux thèmes :

- Formation du personnel scientifique de l'INHE.
- Mise en évidence du premier cas de microsporidiose intestinale au Vietnam.
- Prévalence des microsporidioses intestinales au sein d'une population diarrhéique non identifiée, d'âge, de condition sociale et de statut immunitaire différents.

Notre étude, initialement destinée à l'étude de la prévalence des microsporidioses chez les patients HIV positif au Vietnam, a dû être réévaluée en raison de la méconnaissance des microsporidies et de la situation incontrôlée de l'épidémie du Sida au Vietnam.

B. Matériel et méthodes

1. Introduction

L'étude est établie sur un transfert de connaissance et de technologie du laboratoire de parasitologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes au laboratoire à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoi au Vietnam.

Nos échanges ont porté, tout d'abord, sur une formation théorique des techniciens de laboratoire aux parasites *Encephalitozoon intestinalis* et *Enterocytozoon bieneusi*, et parallèlement, sur la formation aux méthodes et protocoles de mise en évidence de ces microsporidies sur des échantillons de selles, par microscopie optique.

Nous avons analysé des selles de patients diarrhéiques (sidéens et non-sidéens), d'âge et de conditions sociales différentes afin, tout d'abord de mettre en évidence le premier cas de microsporidiose à Hanoi, au Vietnam, puis d'établir une prévalence de cette parasitose chez les patients sidéens en la comparant à celle de patients non sidéens, tout en tenant compte de l'âge et de l'habitat de ces patients.

2. Obtention des échantillons de selles

a. Recrutement des patients

Le recrutement de patients a été difficile. En effet, une étude bien structurée, nécessite l'inclusion de différents lots de populations d'âge, de sexe et de condition sociale différents. Au cours de l'étude, sept départements spécifiques différents d'établissements médicaux ont accepté de fournir des échantillons de selles :

1. Les hôpitaux **Dung Da** et **Bach Mai**, installés dans différents districts de Hanoi, sont des établissements publics à recrutement populaire et étendu sur le Nord Vietnam. Nous avons créé une collaboration avec les départements d'infectiologie et d'allergologie, qui suivent des patients très immunodéprimés, séropositifs au stade SIDA déclaré, ou sous lourde corticothérapie (traitement de lupus érythémateux).

2. L'hôpital des **Enfants Malades** et l'**hôpital Saint Paul** à Hanoi sont des établissements pédiatriques. Ils traitent des enfants en bas âge, le plus souvent encore allaités. Nous avons ouvert une collaboration avec les départements d'infections entériques qui nous remettent des échantillons de selles de patients souffrant de diarrhées inexplicables.

3. Le centre d'accueil et de soins **Ba Vi** pour adultes et enfants à 60km à l'Est de Hanoi dans la province de Ha Tay est un centre de repos. Il possède un département spécifique destiné aux patients sidéens et aux orphelins du SIDA. Il est géré par le ministère de la santé vietnamien et regroupe une population isolée, pauvre, pour beaucoup toxicomane. Il correspond à la fois à un centre d'accueil, de soins secondaires au SIDA (pas de trithérapie mais prise en charge des maladies opportunistes) et d'accompagnement dans la maladie. Ce centre contient 800 places, dont 300 pour les patients contaminés et les orphelins.

4. L'**Institut Militaire** à Hanoi, est un institut qui travaille en collaboration avec l'INHE. Il envoie au laboratoire les échantillons de selles de patients diarrhéiques que le personnel ne peut diagnostiquer. Il suit une population

de patients diversifiée socialement et géographiquement, puisque tous sont employés de l'armée.

5. L'Hôpital International ou l'Hôpital Français à Hanoi est un établissement privé, accessible à une population aisée ou étrangère. Cependant il permet de réaliser un contrôle négatif et d'avoir une comparaison intéressante vis à vis du taux de prévalence des autres établissements.

b. Difficultés rencontrés au recrutement des patients

Le problème principal de cette étude a été l'obtention des selles de patients, plus particulièrement de patients séropositifs pour le VIH. Tout d'abord, au Vietnam, les patients refusent de recueillir leurs selles, par souci culturel et éthique. Ensuite, les échantillons ne sont pas mis à la disposition de la recherche comme en Europe. Leur obtention résulte d'un long processus d'accord. Tout d'abord, le directeur de l'hôpital doit donner son accord pour la collaboration de l'hôpital avec le projet de l'Institut. En effet, la collaboration entre les organismes de soins vietnamiens, même gouvernementaux comme l'INHE, n'est pas acquise. Puis, le chef du service de l'hôpital ou centre concerné donne son accord pour que des infirmières recueillent les selles et remplissent des questionnaires épidémiologiques sur leur temps de travail. Enfin, les échantillons doivent être achetés. Pour ordre d'idée, un échantillon de selles vaut 30 000 dongs, ce qui revient à 1.5 euros par échantillon.

Ainsi pour chaque hôpital, il a fallu :

- obtenir les accords du directeur de l'hôpital et du chef du département de soins
- visiter et rencontrer les médecins responsables des services concernés
- discuter du prix de chaque échantillon, de la rémunération de l'infirmière réalisant le prélèvement, de la méthode et du rythme de livraison.

Le temps total de négociation avec les hôpitaux a été très lourd et prolongé sur toute la durée stage (plusieurs semaines). Par exemple, pour un établissement comme l'hôpital Bach Mai, trois rendez vous avec le chef de service

d'infectiologie ont été nécessaires afin d'obtenir un accord. Puis, deux autres entretiens ont été nécessaires pour assurer le suivi et la pérennité de notre accord.

c. Répartition du nombre d'échantillons selon les différents établissements.

Hôpitaux	Nombre d'échantillons
Bach Mai (département maladies infectieuses)	20
Bach Mai (allergologie)	57
Dong Da (départements maladies infectieuses)	10
Hôpital des enfants malades	6
Hôpital français	10
Centre de Ba Vi	19
Institut militaire	3
Hôpital Saint Paul	88
Total	213

L'obtention des échantillons de selles a été le travail le plus difficile et délicat du stage. En effet, chaque négociation avec les chefs de services concernant l'accord, le prix des échantillons, le taux de rémunération de l'infirmière en charge du prélèvement et enfin le rythme de livraison a été intense et décisive pour la réussite du projet.

3. Construction d'une fiche épidémiologique.

Une fiche épidémiologique a été construite, en deux temps, afin d'aider à l'identification des patients, la discussion et l'expression des résultats.

La première fiche, (annexe 6), sous forme de questionnaire a été remise aux établissements de soins avec les boîtes destinées à recueillir les selles. Rédigée en vietnamien, elle est ainsi accessible au personnel soignant qui ne parle pas anglais. Elle est utilisée pour l'identification des selles des patients et la collecte des informations concernant :

- l'origine des selles,
- la date de prélèvement,
- l'âge du patient,
- le sexe du patient,
- son adresse, son lieu de vie au quotidien,
- sa profession
- son statut immunitaire connu (VIH positif) ou inconnu,
- son taux de CD4 si possible,
- ses symptômes associés,
- des particularités épidémiologiques tel que son statut social, son type alimentation, la présence ou non d'animaux dans son habitat.

En effet, il est impossible de différencier le lot de population selon le seul critère HIV positif ou négatif car le diagnostic n'étant pas systématique à l'hôpital, le risque d'obtenir des selles de patients vietnamiens contaminés et qui ne le savent pas est non négligeable.

La seconde forme est une fiche épidémiologique destinée au laboratoire de l'Institut (annexe 7) reprenant la plupart des informations de la page précédente, en anglais, et complétée par une zone réservée aux informations concernant l'analyse au laboratoire, telles que l'aspect, la couleur des selles et le résultat de la lecture microscopique.

Deux fiches épidémiologiques, l'une pour l'hôpital, l'autre pour le laboratoire de l'INHE ont été rédigées afin de recenser les renseignements nécessaires à l'analyse des échantillons tels que l'âge, le sexe, le statut immunitaire, l'adresse, le lieu de vie au quotidien, les symptômes associés, le statut social, le type d'alimentation des patients, ainsi que leur proximité de vie avec les animaux, considérés comme de possibles vecteurs.

4. Mise au point de la technique

Les techniques utilisées pour la mise en évidence de microsporidies dans les selles à l'Institut sont microscopiques. Basées sur la méthode normalisée au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes, les protocoles utilisés sont : la coloration à base d'agent fluorescent de Van Gool (annexe 4), couplée à la méthode au trichrome modifié de Weber (annexe 5).

a. Stage au laboratoire de parasitologie de CHU de Nantes

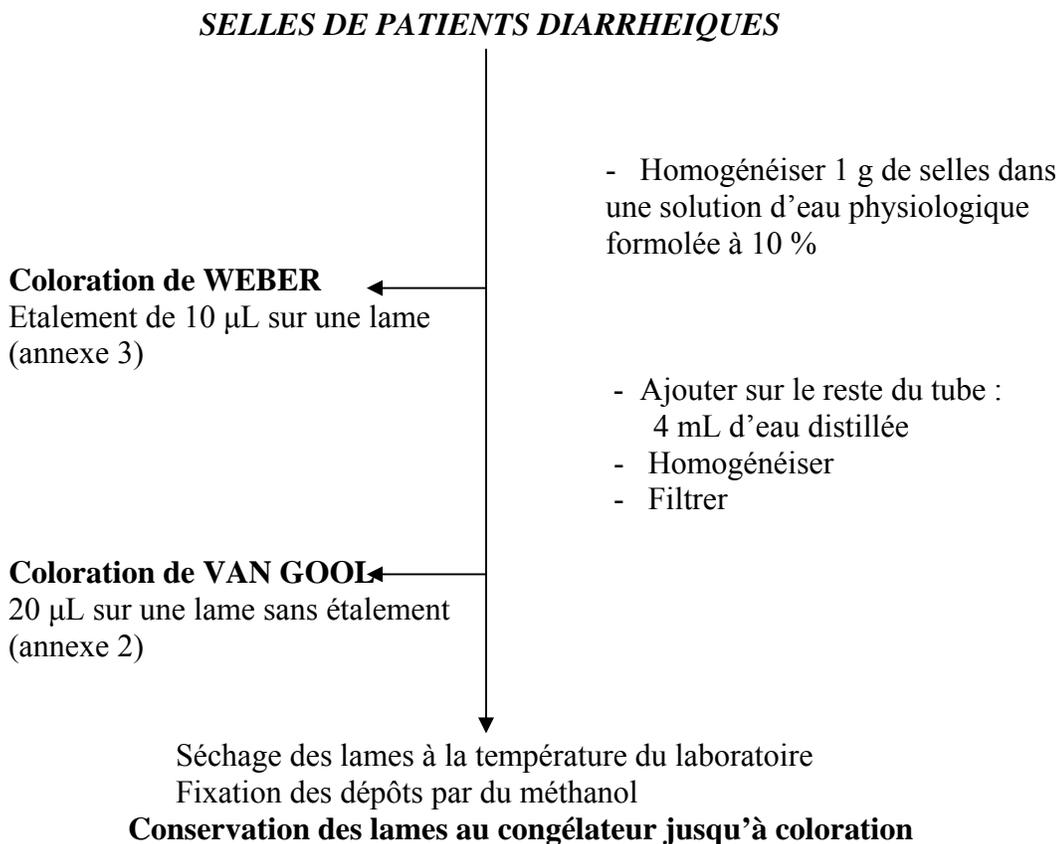
Ce stage au laboratoire de parasitologie a été une étape nécessaire à ma formation personnelle aux techniques de diagnostic des microsporidies intestinales humaines. Il a été effectué en septembre 2004, à raison de deux semaines à temps complet. Il m'a permis d'être formée aux protocoles de mise en évidence de microsporidies *E. bienewisi* et *E. intestinalis* dans les selles, et surtout à la lecture microscopique des lames d'échantillons en fluorescence et en lumière naturelle. De plus, il m'a permis de réaliser les lames de témoins positifs, amenées ensuite pour l'étude au Vietnam.

b. Apport du matériel

Les matières premières nécessaires à l'élaboration des produits et solutions de colorations ont été apportées de France, fournies par le laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes. Ces solutions ont été préparées à l'aide des modes opératoires rédigés au laboratoire de parasitologie. Afin de vérifier la bonne conservation et l'état des produits, il a été amené des lames de témoins positifs du CHU de Nantes. A chaque coloration, une d'entre elles est colorée en parallèle comme témoin positif afin de visualiser les spores de microsporidies et de s'assurer que l'étape de coloration s'est bien déroulée. La certitude du diagnostic est ensuite établie par biologie moléculaire et par amplification génique en PCR temps réel au

laboratoire de parasitologie de Nantes. Cette partie de l'analyse est effectuée par une interne en pharmacie, Anne Espern. Les résultats obtenus lui permettront de rédiger une thèse plus technique sur le diagnostic des microsporidioses intestinales.

Voici un schéma présentant la méthode de préparation de lame pour les deux colorations utilisées, c'est-à-dire à base d'agent fluorescent UVIBIO, et de trichrome de Weber, à partir des échantillons de selles.



Les lames sont ensuite colorées par les deux méthodes complémentaires de Van Gool, puis de Weber. La lecture est réalisée à l'objectif 100, à l'immersion. La méthode de Van Gool nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence équipé d'un système d'UV contenant un filtre dont les spécificités permettent la mise en évidence des microsporidies :

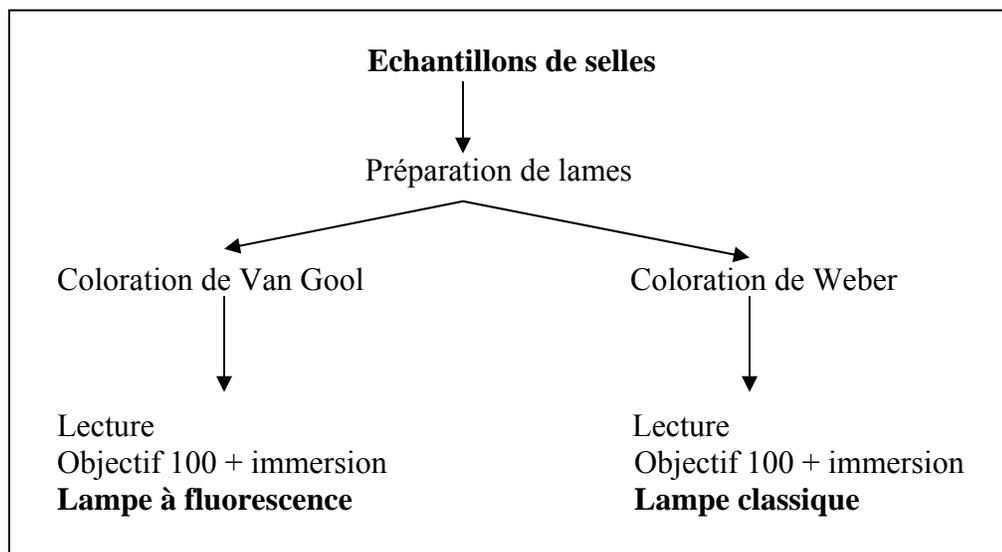
- Filtre d'excitation : 355 à 425 nm,
- Filtre de suppression : 460 nm

L'Institut a déjà été équipé de ce type de microscope lors d'une étude antérieure sur les *Cyclospora* réalisée en collaboration entre le laboratoire de parasitologie et l'Institut, et par les partenaires financiers de l'époque²⁷.



Photo n°12

La lecture des lames colorées par la méthode de Weber se fait en lumière classique, à l'objectif 100 et à immersion.

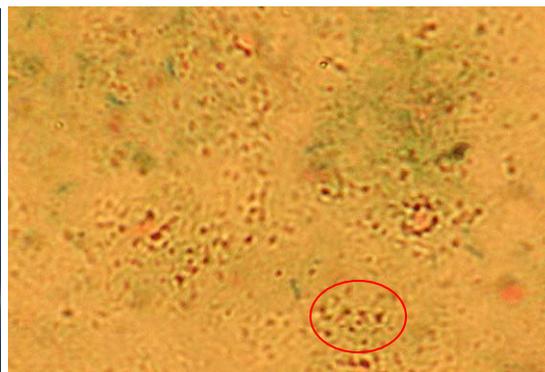


²⁷ Photo n°12 : Photo présentant le microscope utilisé pour l'étude à l'Institut, janvier 2005

Les deux photos suivantes présentent l'image lue à l'aide des deux différentes méthodes de colorations. Elles ont été prises au laboratoire de l'Institut à partir d'échantillons positifs.



²⁸ Photo n°13 : Méthode de Van Gool



²⁹ Photo n°14 : Méthode de Weber

La spore présentée dans les cercles rouges a exactement la même taille. Cependant, elle apparaît plus grande avec la coloration de Van Gool, car la fluorescence apporté par l'agent de coloration et, réfléchié au microscope.

En pratique, la méthode de diagnostic des microsporidioses intestinales humaines a été abordée à l'Institut en deux temps. Tout d'abord, un stage de formation personnelle, au CHU de Nantes, a été nécessaire afin d'apprendre les protocoles de mise en évidence (Van Gool et Weber), ainsi que les techniques de lecture au microscope pour les deux méthodes retenues. Puis, le matériel et les produits nécessaires à l'étude au Vietnam ont été apportés et adaptés au laboratoire de l'Institut.

²⁸ Photo n° 13 : Photo d'un échantillon de selles positives à *E. bienewisi* en coloration par le méthode de Van Gool, collection personnelle, janvier 2005.

²⁹ Photo n° 14 : Photo d'un échantillon de selles positives à *E. bienewisi* en coloration par la méthode de Weber, collection personnelle, janvier 2005.

C. Formation du personnel

1. Travail de formation du personnel de l'Institut National d'Hygiène et d'épidémiologie

Cette étape de l'étude est très importante afin d'informer le personnel scientifique et soignant sur l'aspect, la classification, la pathogénicité du parasite et également pour justifier une telle entreprise au Vietnam.

a. Formation initiale

Elle a été mise en place dès le début du stage à l'Institut en Octobre 2004. Elle a consisté en la rédaction d'un petit dossier en anglais, indiquant les informations principales concernant le parasite, par la traduction en anglais de tous les protocoles de laboratoire apporté du laboratoire de parasitologie de Nantes. Enfin, des séances de « travaux pratiques » ont été organisées, pour présenter les protocoles de préparation de lames à partir des échantillons de selles, des techniques Van Gool et Weber, et enfin pour expliquer la lecture des lames au microscope.

b. Formation continue

Différentes conférences de parasitologie ont eu lieu au cours de ces dix mois passés à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie à Hanoi. Pour certaines, une présentation concernant les microsporidioses humaines a été programmée. Elles ont été réalisées en anglais, seconde langue la plus parlée au Vietnam aujourd'hui.

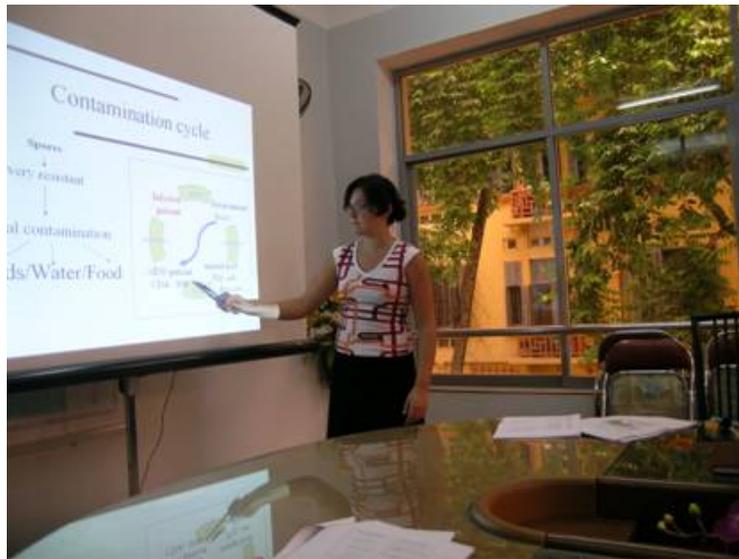
Ainsi :

- **23 Octobre 2004** : Conférence sur les parasites émergent au Vietnam. Elle a donné l'occasion de la présentation du projet, de ses objectifs, ainsi que des premières informations sur les microsporidies

- **10 Janvier 2005** : Cette mini conférence m'a été exclusivement dédiée. J'ai pu présenter sous forme de cours tous les aspects biologiques et pathogéniques du parasite.

- **23 Juin 2005** : Conférence synthèse sur les projets en réalisation à l'Institut. Elle a permis une remise à niveau des connaissances sur les microsporidies et la présentation de résultats préliminaires concernant l'étude.

La photo n°15 suivante me présente lors de la conférence du 23 juin 2005,³⁰.



³⁰ Photo n°15 : Photo d'une conférence sur les microsporidies intestinales humaines, collection personnelle, du 23 juin 2005

2. Formation pour le personnel d'autres laboratoires

Au mois de juin 2005, l'Institut Militaire de Hanoi a demandé à ce que son personnel puisse être formé au diagnostic des microsporidioses intestinales humaines. La formation s'est déroulée sur un mois, du 10 juin 2005 à début de juillet 2005. Les techniciennes sont venues à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie avec des échantillons recueillis à l'hôpital militaire de Hanoi. Nous les avons préparés, colorés, analysés et lus ensemble.



³¹ Photo n°16 :
Techniciennes de l'Institut Militaire de Hanoi en formation au laboratoire de l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie

L'étape de formation du personnel de l'Institut a été capitale. En effet, les microsporidies n'ayant jamais été étudiées au Vietnam, les techniciens ont découvert les modes et méthodes de diagnostic. Cette formation a été effectuée en deux temps, tout d'abord théorique au tout début du stage, puis plus pratique et continue au long de l'année. De plus, différentes conférences et cours, en anglais ont été organisées à l'Institut afin de présenter notre projet et de former d'autres équipes au diagnostic des microsporidioses intestinales.

³¹ Photo n°16 : Techniciennes de l'institut militaire de Hanoi en formation à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie, collection personnelle, Juillet 2005.

D. Résultats expérimentaux

1. Répartition géographique des échantillons

a. Répartition sur le Nord Vietnam

Le choix varié des hôpitaux a permis une répartition de la provenance des échantillons sur la moitié nord du pays.

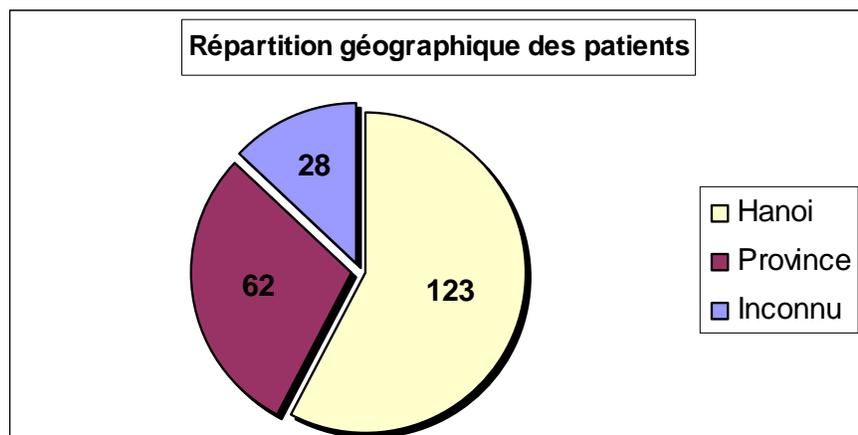
Les échantillons proviennent des provinces de la carte (schéma n°10) ci-dessous ³².



³² Schéma n°10 : Carte des provinces de la moitié nord du Vietnam, scannée à partir d'une carte de l'Institut de Hanoi, en Mars 2005

En nombre, la répartition des échantillons est assez inégale. En effet, beaucoup d'échantillons proviennent de la province de Hanoi. Cette inégalité est due à la localisation de cinq sur six hôpitaux au sein même de la ville de Hanoi. Les échantillons de localisations extérieures à Hanoi proviennent de patients transférés des hôpitaux de campagne aux hôpitaux de ville, en raison de leur état critique de santé, afin d'avoir une meilleure prise en charge.

Le graphique n°2 suivant présente la répartition en nombre des échantillons utilisés pour l'étude³³.

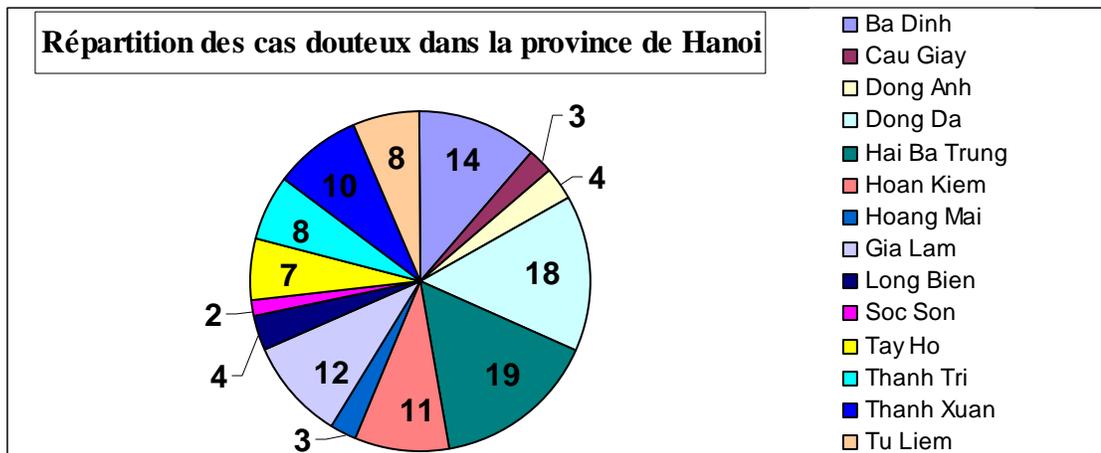


³³ Graphique n°2 : Graphique présentant la répartition en nombre des échantillons utilisés pour l'étude, établi à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, Juillet 2005

b. Répartition sur la province de Hanoi

La répartition en nombre des échantillons provenant de la province de Hanoi est très variable en fonction des districts. Cette province est constituée de 14 districts, de superficie, densité et de situation sociale variables.

Le graphique n°3 suivant présente la répartition en nombre des échantillons de la province de Hanoi, répartie entre les 14 districts que compte la province³⁴.



La répartition des échantillons, même si elle est étendue à toutes les provinces du Nord du Vietnam, est très inégale en nombre. En effet, plus des 3/4 des échantillons proviennent de la province de Hanoi. Au sein même de cette province, les échantillons varient en nombre parmi les 14 districts que compte la province. Ce déséquilibre est dû à la localisation des centres de soins qui ont fourni les échantillons, pour la plupart (5 sur 6) situés à Hanoi.

³⁴ Graphique n°3 : Graphique présentant la répartition en nombre des échantillons provenant des différents districts de la province de Hanoi, établi à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, juillet 2005.

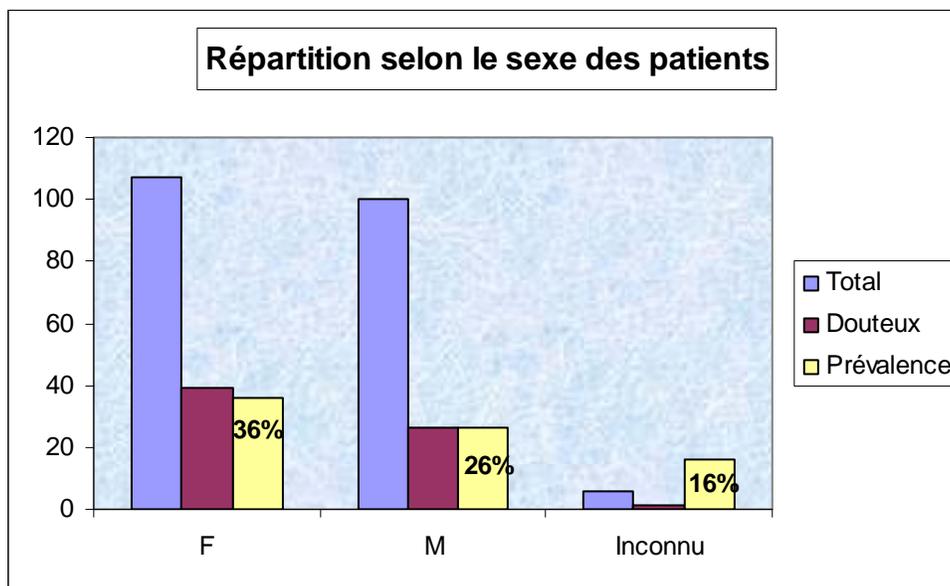
2. Résultats généraux

a. Prévalence de cas douteux

Sur le nombre total de 213 échantillons analysés au cours de l'étude, 68 échantillons sont douteux en microscopie, soit une prévalence globale de **32%**. Cependant, une étude biomoléculaire par PCR est nécessaire afin de confirmer ou infirmer ce résultat. On ne peut donc pour le moment présenter que des cas douteux, pour lesquels la lecture en microscopie a laissé apparaître des organismes semblables à une ou plusieurs spores de microsporidies.

b. Répartition des cas douteux par sexe

Le graphique 4 suivant présente la répartition de cas douteux en fonction du sexe des patients³⁵. Le taux de prévalence est plus important chez les personnes de sexe féminin (36%).



³⁵ Graphique n°4 : Graphique présentant la répartition des échantillons douteux, en fonction du sexe des patients, établi selon l'analyse des fiches épidémiologiques, septembre 2005

c. Répartition des cas douteux selon l'âge des patients

La répartition des cas douteux selon l'âge des patients, sur le graphique n°5, apparaît elle aussi, variable³⁶. Les tranches d'âge de 30 à 40 ans (58%) et de 40 à 50 ans (60%) apparaissent être les plus touchées. Cependant le nombre total d'échantillons dans la classe des 40 à 50 ans étant faible, le taux de prévalence n'est peut être pas représentatif de la population générale.

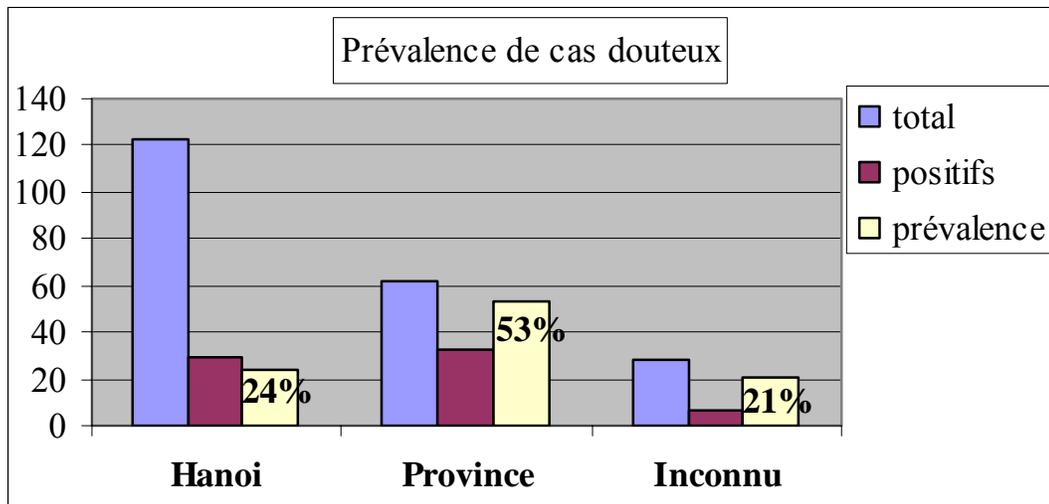


³⁶ Graphique n°5 : Graphique représentant la répartition des échantillons douteux selon l'âge des patients, établi à partir des fiches épidémiologiques, septembre 2005

d. Répartition géographique des cas douteux

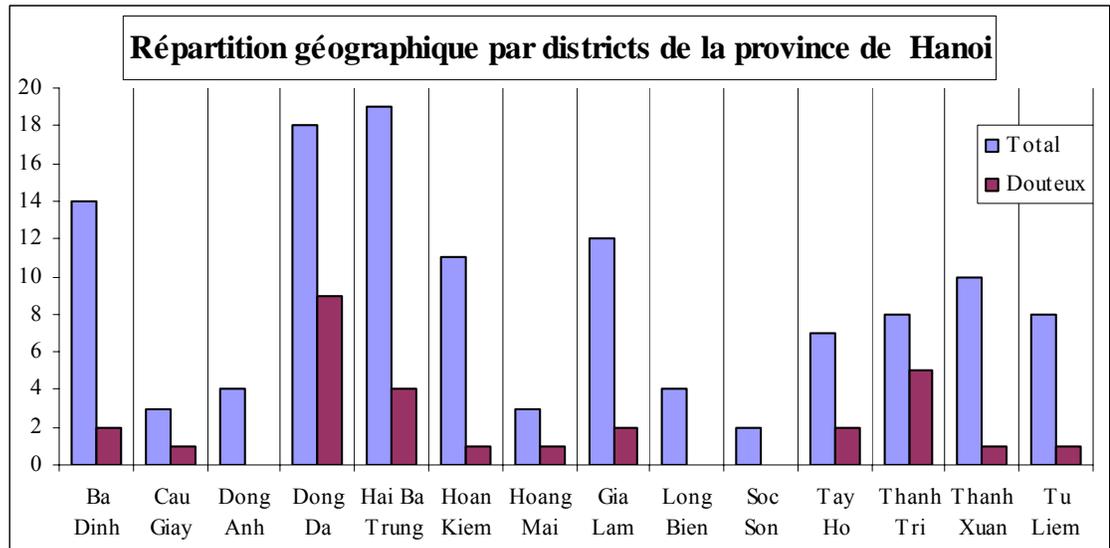
Une différence significative apparaît pour la prévalence de cas suspectés en microscopie entre la province de Hanoi (24%) et les autres provinces (53%). Cette différence relate les conditions de vie, et d'hygiène inégales entre la ville et la campagne.

Le graphique n°6 suivant présente la prévalence de cas présentis selon que les échantillons proviennent de la province de Hanoi ou des autres provinces du Nord du pays³⁷.



³⁷ Graphique n°6 : Graphique présentant le pourcentage d'échantillons douteux dans la province de Hanoi et les autres, établi à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, septembre 2005 .

Au sein même de la province d'Hanoi, l'inégalité en nombre est moins perceptible. Le graphique n°7 suivant présente la répartition des cas douteux dans les différents districts de la province de Hanoi³⁸.



Sur le graphique, on peut remarquer que le nombre de cas douteux est proportionnellement important dans deux districts de Hanoi, Dong Da et Thanh Tri. Le taux de prévalence à Dong da est de 50%, alors qu'il est de 58% à Thanh Tri. Ces deux districts sont excentrés du cœur de Hanoi, et assez pauvres. En surnombre, les familles vivent dans de petites maisons insalubres. Au contraire, à Ba Dinh et Gia Lam, qui sont des provinces nettement plus riches et moins excentrées du cœur de Hanoi, le pourcentage de cas douteux n'est que de 18%.

³⁸ Graphique n°7 : Graphique présentant la répartition des cas douteux dans les différents districts de la province de Hanoi, établi à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, octobre 2005

Dans notre étude, le pourcentage moyen de cas suspects de microsporidies intestinales, après examen microscopique est de 32%. Il est deux fois plus important à la campagne qu'à Hanoi, passant de 24% à 53%. De même, au sein de la province de Hanoi, les taux entre les districts sont très variables. Le taux à Dong da est de 50%, et de 58% à Thanh Tri. Ces deux districts sont excentrés du coeur de Hanoi, et assez pauvres. Les provinces de Ba Dinh et Gia Lam, qui sont des provinces nettement plus riches et moins excentrées du coeur de la ville, présentent un taux de 18%. Une différence moins nette apparaît entre les hommes et les femmes, les hommes étant atteints à 26 % alors que pour les femmes le pourcentage est de 36%. Enfin la tranche d'âge des 30 à 40 ans est la plus concernée par une infection à microsporidies.

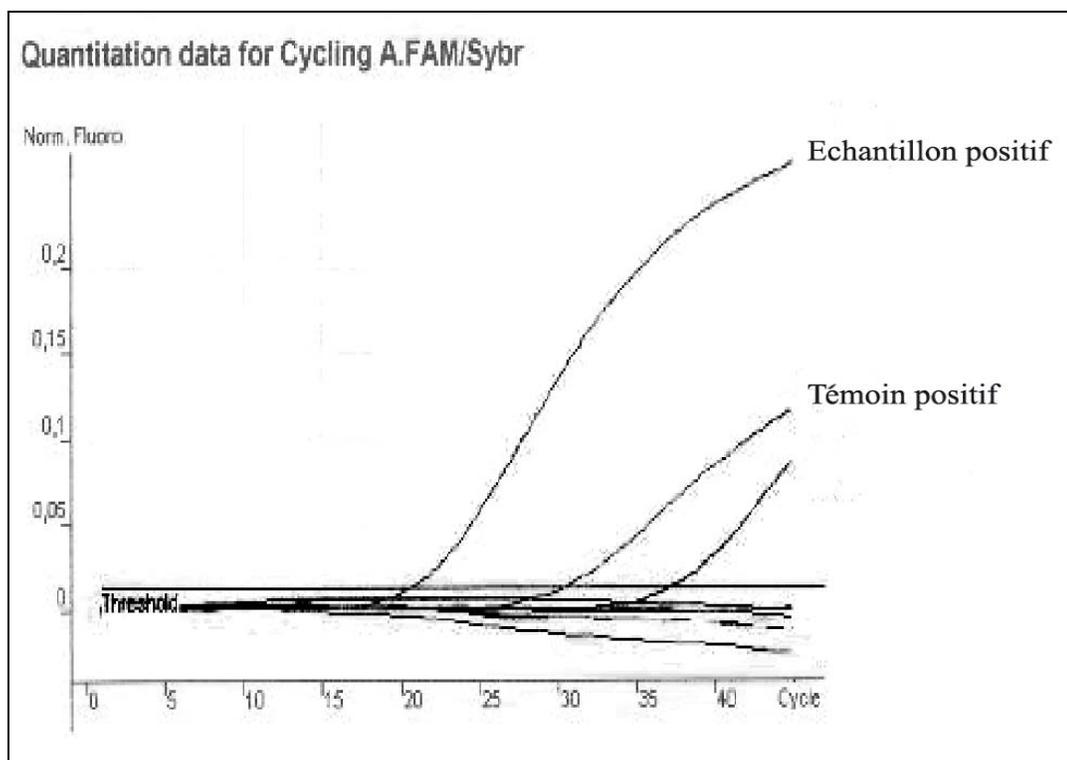
Cette analyse s'approche très sensiblement des résultats d'études antérieures portant sur la recherche de microsporidies dans les selles par méthode microscopique.

Cependant les cas qui, après examen microscopique, me sont apparus potentiellement positifs doivent être contrôlés par PCR. En effet, les résultats d'études récentes démontrent qu'un nombre conséquent d'échantillons dépistés douteux en microscopie sortent négatifs en PCR. Ainsi, nous ne pouvons négliger dans notre étude la présence possible d'éléments inconnus, de petite taille et fluorescents avec la méthode utilisée de Van Gool, qui peuvent fausser nos résultats.

3. Mise en évidence du premier cas de microsporidiose intestinale à *Enterocytozoon bienewisi* à Hanoi.

Ce premier cas a été dépisté par microscopie optique au laboratoire de l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoi le 22 Novembre 2004. Il a été confirmé par PCR temps réel au laboratoire de parasitologie à Nantes le 21 Décembre 2004. L'échantillon a été prélevé par l'hôpital Militaire de Hanoi (fiche épidémiologique en annexe 8), et envoyé à l'Institut afin d'aider au diagnostic de la diarrhée. En effet, le patient souffrait depuis plus d'un mois d'une diarrhée chronique et les médecins n'en déterminaient pas la cause. Après préparation et coloration de l'échantillon, la lecture microscopique a permis de penser fortement au diagnostic de microsporidiose. L'analyse biologique de l'échantillon en PCR, effectuée au CHU de Nantes a confirmé le diagnostic de microsporidiose intestinale et permis de déterminer l'espèce en cause : *Enterocytozoon bienewisi*.

Le schéma n°11 suivant présente le résultat de la PCR temps réel effectuée au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes³⁹.



Suite à la découverte du premier cas de microsporidiose intestinale à *E. bienewisi*, et après concertation entre les différents partenaires, il a été décidé de publier un article sous forme de présentation de cas. L'écriture a débuté en janvier 2005. Une première soumission au journal « Médecine et maladies infectieuses » a été faite en Février 2005. Après quelques modifications, l'article (annexe 10) été définitivement accepté et mis sous presse en Août 2005.

³⁹ Schéma n°11 : Courbe de résultat de l'analyse du 1^{er} échantillon positif, en PCR temps réel, Décembre 2004

4. Mise en évidence du premier cas de microsporidiose intestinale humaine à *Encephalitozoon intestinalis* à Hanoi.

Le premier cas de microsporidiose intestinale à *Encephalitozoon intestinalis* a été mis en évidence par méthode microscopique le 23 février 2005 au laboratoire de l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoi, et confirmé par une PCR en temps réel au laboratoire du CHU de Nantes en juillet 2005. L'échantillon concerné provient du centre de Ba Vi situé à 60 km à l'Est de Hanoi. Ce centre accueille, entre autre, une population de femmes prostituées ou droguées et d'enfants orphelins. Nous sommes allés visiter et recueillir des échantillons de selles de patients de ce centre une fois par mois de Janvier à Juin 2005. Le patient est une femme séropositive de 27 ans. Elle souffre de diarrhées, douleurs abdominales et d'une grande fatigue. Les selles étudiées sont de couleur marron et d'apparence aqueuse. Après la suspicion de présence de spores de microsporidies dans les selles par microscopie, l'échantillon a été testé en PCR temps réel pour l'espèce *E. bienewisi*. Le résultat étant négatif, nous avons recherché avec succès une autre espèce responsable de diarrhée chronique chez l'immunodéprimé : *Encephalitozoon intestinalis*.

Le premier cas de microsporidiose intestinale à *E. bienewisi* a été identifié en Décembre 2004. Il a été dépisté par microscopie à l'Institut National D'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoi, puis confirmé par PCR en temps réel au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes. Cette découverte a donné lieu à une publication de cas dans le journal « Médecine et Maladies Infectieuses », parue en Août 2005 chez Elsevier. De même, un second cas, mais cette fois-ci à *E. intestinalis* a été mis en évidence, dans les mêmes conditions, en Juillet 2005.

En s'appuyant sur les premiers résultats de l'étude, un poster (annexe 9) présenté aux congrès PHARO le 16 Septembre 2005, et RICAI le 1^{er} et 2 Décembre 2005, par Anne Espern, interne responsable de l'étude biomoléculaire des échantillons de selles potentiellement positifs du Vietnam.

5. Analyse des résultats

Le pourcentage moyen de cas suspects de microsporidies intestinales pour notre étude est de 32%. Ce chiffre apparaît élevé, et il ne peut pas être comparé à d'autres pays de la région. En effet, peu d'études ont précédemment été conduites en Asie du Sud Est et, aucune n'a porté sur une population diarrhéique, d'âge et de situation sociale variables n'a été réalisée. Seuls quelques cas de microsporidies ont été rapportés en Thaïlande (Wanachanawin, 1998), et une recherche de microsporidies intestinales chez des enfants d'un orphelinat de Bangkok a été réalisée par Chokephaibulkit en 2001.

A Hanoi, les femmes et la classe de 30 à 40 ans sont les personnes les plus exposées au risque de contamination par les microsporidies. Le taux de contamination apparaît deux fois plus important à la campagne qu'à Hanoi, passant de 24% à 53%. De même, au sein de la province de Hanoi, le taux moyen de cas potentiellement positifs entre les districts sont très variables. Il atteint 58 % à Thanh Tri, alors qu'il est de 58% à Dong Da. Ces deux districts sont excentrés du Coeur de Hanoi, et sont assez pauvres. Généralement en surnombre, les familles vivent dans de petites maisons insalubres, construites sur des zones inondables. En effet, elles sont situées du mauvais côté de la digue qui protège le centre de Hanoi des crues du fleuve rouge. Au contraire, à Ba Dinh et Gia Lam, qui sont des provinces nettement plus riches, le taux de prévalence n'est que de 18%.

Ces différences sont très significatives et différentes raisons sont envisageables. Tout d'abord, les conditions d'hygiène, ainsi que les outils de distribution d'eau en zone rurale peuvent être des vecteurs directs de microsporidies. De plus, la proximité de vie au quotidien des animaux domestiques (chats, chiens), et surtout des animaux de la ferme (poulet, cochon, buffles..) avec la population apparaît comme un facteur de risque. En effet, des études réalisées depuis quelques années laissent penser que les chats et les cochons soient des vecteurs de contamination (Sulaiman, 2004).

Cependant, ces chiffres doivent être réévalués par analyse en biologie moléculaire, notamment par PCR. En effet, la microscopie optique seule n'est pas la méthode la plus scientifiquement fondée pour le diagnostic systématique de microsporidioses. Beaucoup d'organismes telles que les levures peuvent être confondus avec les microsporidies, et ce de part leur taille, leur forme et leur fluorescence. La distinction nécessite un bon entraînement du lecteur.

La recherche parasitologique des microsporidies à partir de coloration de selles permet un diagnostic rapide et peu coûteux. Cependant, afin d'établir un résultat alliant spécificité et sensibilité, il est nécessaire de coupler cette technique à une méthode biologique de diagnostic telle que la PCR en temps réel.

Les résultats obtenus dans cette étude (32% de pourcentage moyen) doivent être objectivés par l'étude en PCR des échantillons douteux, afin tout d'abord d'infirmier ou d'affirmer le résultat, puis d'identifier les espèces en cause. En effet, l'étude microscopique et l'entraînement du lecteur ne suffisent pas à affirmer le diagnostic d'une infection à microsporidies.

D. Discussion

1. Origine des difficultés

La barrière de la langue constitue une difficulté majeure, qui peut être à l'origine de qui proquo, de malentendus, de vexations... Cette différence exige de prêter une grande attention à ce que souhaite exprimer l'autre, mais nécessite également de notre part une expression claire, simplifiée, schématique (schéma de protocoles...) afin de souligner les priorités. D'autre part, il faut toujours s'assurer que l'on se fait bien comprendre. A l'Institut, la majorité des collaborateurs du professeur Phung Dac Cam et lui même, parle un anglais courant, ce qui est très différent des médecins et directeurs d'hôpitaux. Cependant, il faut toujours se méfier de ce qui a pu être compris, essayer de percevoir la réaction à ce que l'on a exposé.

La barrière culturelle et éthique, même si elle paraît s'estomper, est belle et bien présente. Le plus souvent, au début, elle nous échappe à nous occidentaux, et il est difficile d'en connaître les véritables conséquences. Elle explique par exemple, la grande difficulté pour obtenir des échantillons de selles de patients sidéens même hospitalisés, ou bien d'obtenir des réponses fiables et reproductives dans une enquête épidémiologique.

La situation de l'épidémie du virus du Sida au Vietnam est inquiétante, pour nous occidentaux, et difficile à reconnaître pour la population vietnamienne. Cette maladie est encore très mal connue et engendre d'importantes discriminations, et exclusions de la population. C'est pourquoi, les vietnamiens ne désirent pas participer à un dépistage systématique, même s'il est gratuit, par peur des conséquences sur leur vie sociale. De même, ils n'ont pas accès, aujourd'hui encore, à une trithérapie antivirale et à un suivi médicalisé qui pourrait les aider à mieux vivre avec leur maladie, et donc préfèrent rester dans l'inconnu que de s'affliger une vérité inextricable.

2. Conséquences

La plus lourde conséquence a été la difficulté à obtenir des échantillons de selles de patients HIV. Elle est sous jacente à la complexité de compréhension linguistique avec nos interlocuteurs (directeurs hôpitaux et responsables de services) ; à l'éthique des vietnamiens sceptiques à recueillir leur selles; mais également à la méfiance voir au refus des infirmières à prélever des selles de patients sidéens par méconnaissance des voies de contamination du virus et des consignes de sécurité à adopter.

Puis il existe d'autres conséquences "plus attendues" :

- La lenteur et la difficulté de la mise en place du projet dans un pays asiatique où la culture et la méthode de travail sont très différentes par rapport aux coutumes françaises.

- La difficulté de former le personnel aux protocoles de laboratoire. Il a été nécessaire de traduire les protocoles (annexe 1, 2 et 3) en anglais simple et très schématisé afin de s'assurer qu'ils soient bien compris et réalisés.

- La difficulté de maintenir l'étude à un rythme constant, tant dans la fréquence de réception des échantillons, que dans l'intérêt porté à l'étude. En effet, l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie à créer ces dernières années des partenariats avec de nombreux pays occidentaux, et une sorte de compétition s'est installée entre les projets. Notre projet n'étant pas de grosse envergure et peu subventionné, l'équipe a plusieurs fois mis la priorité de temps et d'argent sur d'autres travaux que le nôtre. Il a régulièrement fallu rediscuter des promesses et des accords mis en place au début du stage, et ce en se basant sur l'amitié qui lie le laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes, et le professeur Phug Dac Cam, directeur du service de parasitologie de l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie.

3. Réalisations des objectifs

A son commencement, le projet avait pour mission d'établir une prévalence des microsporidioses intestinales dans la population HIV à Hanoi, et d'élargir, si possible cette étude à une enquête épidémiologique. Face à toutes les difficultés rencontrées, et principalement à la non possibilité d'obtenir suffisamment de selles de patients HIV, nous avons dû revoir nos objectifs. Ainsi, notre travail s'est recentré sur la recherche de microsporidioses intestinales dans une population de patients diarrhéiques à Hanoi et dans ses environs.

Afin d'établir une prévalence représentative de la population générale, nous avons espéré un nombre proche de 800 selles, soit environ 20 selles par semaine. Au terme du stage, nous avons analysé 213 échantillons de selles. Ce nombre est nettement en dessous de nos objectifs. Ceci s'explique par la très grande difficulté à obtenir des échantillons de la part des hôpitaux, mais aussi au temps conséquent consacré aux discussions, négociations, et séances de formation des équipes.

De plus, ce résultat peut être le regard de la réaction frileuse du personnel de l'Institut à nous autoriser d'étudier un parasite opportuniste du SIDA. En effet, face à l'évolution de l'épidémie, et les méthodes de diagnostic n'étant pas accessibles pour les hôpitaux en raison de leurs coûts élevés, il est possible qu'une partie de la population soit porteuse du virus sans le savoir. Dans cette situation particulière, nous risquions, par la mise en évidence chez certains patients d'une parasitose opportuniste, de diagnostiquer cliniquement des patients susceptibles d'être porteurs du virus. Une question éthique s'est alors rapidement imposée. En effet, notre projet n'avait pas les moyens techniques et économiques d'assurer une prise en charge et un suivi de leur maladie.

Enfin, l'épidémie de Sida n'étant pas contrôlée au Vietnam, une mise en avant de ce fléau, au travers de notre étude, aurait pu être mal acceptée.

Conclusion

Au-delà d'un apport scientifique, ce stage de dix mois a été extrêmement riche en relations humaines. Le temps consacré à la visite des centres, à la rencontre des patients, et des médecins a été très enrichissant sur le plan personnel. Des études antérieures ayant déjà été effectuées en partenariat avec l'hôpital de Nantes, il était important d'entretenir et d'intensifier ces contacts. L'accueil d'une technicienne vietnamienne du service du professeur Phung Dac Cam au laboratoire de parasitologie de Nantes en Septembre 2005 démontre que ces relations perdurent. De plus, l'accueil et le suivi de mon séjour au Vietnam par le professeur Phung Dac Cam ont été très amicaux et chaleureux

REFERENCES

1. Photos :

- Photo n° 1: Spore d'Enterocytozoon bienewi en Microscopie Electronique à Balayage, collection du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes
- Photo n°2 : Germination d'une spore de *Nosema algeriae* en Microscopie Electronique à Balayage <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis> consulté le 2 juin 2005
- Photo n°3: Center for Disease Control.
<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>, Spore de *E. bienewi* en microscopie électronique, consulté le 3 mai 2005.
- Photo n°4: : Photo de spores d'Enterocytozoon bienewi colorées par la méthode de Giemsa, collection du laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes
- Photo n°5 : Photo numérique de spores de microsporidies prise en microscopie à fluorescence ; 1^{er} cas positif de microsporidiose intestinale chez un patient sidéen, Hanoi , collection personnelle décembre 2004.
- Photo n°6 : Spores d'Enterocytozoon bienewi colorées par la méthode de trichrome de Weber, collection personnelle.
- Photo n°7: Center of Disease Control.
<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>. Photo de spore de *E. intestinalis* identifié par méthode antigénique., consulté le 3 mai 2005.
- Photo n°8 : Photo de l'entrée de l'institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie, collection personnelle, juillet 2005
- Photo n°9 : Photo du laboratoire et de deux techniciennes du service de parasitologie de l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie à Hanoi, collection personnelle, juin 2005
- Photo n°10 et 11 : Photo d'un enfant de la minorité Hmongs noirs, et d'une maison Hmong Noir dans la région nord du Vietnam , collection personnelle, Mai 2005

- Photo n°12 : Photo d'un enfant contaminé et d'une soignante du centre d'accueil aux patients sidéens de Ba Vi au Nord Est de Hanoi, collection personnelle, février 2005.
- Photo n°13 : Photo d'un échantillon de selles positives en coloration par le méthode de Van Gool, collection personnelle, janvier 2005.
- Photo n°14 : Photo d'un échantillon de selles positives en coloration par la méthode de Weber, collection personnelle, janvier 2005
- Photo n°15 : Photo d'une conférence sur les microsporidioses intestinales humaines, collection personnelle, du 23 juin 2005
- Photo n°16 : Techniciennes de l'Institut militaire de Hanoi en formation à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie, juillet 2005.

2. Tableaux :

- Tableau I: Bryan and Schwartz, 1999, The Microsporidia and Microsporidiosis, American society of Microbiology, Washington, Wittner M., Weiss L (Eds).
- Tableau II : Bettens, 1999 ; Keeling, 2002. Les infections à microsporidies, Louvain med. 118: 446-456, 1999.
- Tableau III : Louvain, 1999 .Caractéristiques morphologiques et épidémiologiques des principales espèces de microsporidies rencontrées en pathologie humaine
- Tableau IV: Tableau des principales manifestations clinique des microsporidioses, Miegerville M, Rapport sur les microsporidioses, 2004.
- Tableau V : Center for Disease Control. Microsporidiosis Pathologies induites par les microsporidies humaines.
<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/>, consulté en juin 2005.
- Tableau VI : Revue "Emerging Infectious Disease". Séquences de primers spécifiques pour le diagnostic de microsporidioses humaines. Vol 2 n° 3 sept 1996.
- Tableau VII : comparaison de méthodes diagnostiques pour les espèces *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis*.

3. Schémas :

- Schéma n°1: Keeling and Fast. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced intracellular parasites, Revue annuelle Microbiologie, 2002.
- Schéma n°2 : Site Internet Paleos, generalized microsporidia spore, www.palaeos.com/.../Images/GeneralizedSpore.jpg, consulté le 12 Avril 2005
- Schéma n°3 : Desportes I. Evolution de la notion de spécificité parasitaire chez les microsporidies, conférence « *Evolution des parasites et des relations hôtes parasites* » à l'école doctorale, 2-3-4 mai 2001.
- Schéma n°4 : Cavalier-Smith. A revised six-kingdom system of life, 1998, Biol. Rev. Camb. Philos. Soc, 73, 203-206..
- Schéma n°5: Keeling, Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu. Rev. Microbiol., 2002.56, 93-116.
- Schéma n°6 : Desportes I. Evolution de la notion de spécificité parasitaire chez les microsporidies, conférence « *Evolution des parasites et des relations hôtes parasites* » à l'école doctorale, 2-3-4 mai 2001.
- Schéma n°7: Center of Disease Control, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis>. Comparaison du développement de *E. intestinalis* et *E. bienewisi*, consulté le 22 mai 2005.
- Schéma n°8 : Foyer infectieux chez l'homme des espèces de microsporidies *Enterocytozoon* et *Encephalitozoon*. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis> DPDx, laboratory Identification of parasites of Public Health Concern, Center for disease Control et Prevention, 2005
- Schéma n°9 : Center of Disease control, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis> Bandes diagnostiques de microsporidies humaines amplifiées par des primers spécifiques PCR et révélées sur un gel d'agarose à 2 %, consulté en mai 2005

- Schéma n°10 : Carte des provinces de la moitié Nord du Vietnam, scannée à partir d'une carte de l'Institut, mars 2005.
- Schéma n°11 : Courbe de résultat de l'analyse du 1^{er} échantillon positif, en PCR temps réel, Décembre 2004

4. Graphiques :

- Graphique n°1 : Graphique relatant le niveau de pauvreté de la population vietnamienne en 2000, ambassade du Canada, 2005.
- Graphique n°2 : Graphique présentant la répartition en nombre des échantillons utilisés pour l'étude, établi à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, juillet 2005
- Graphique n°3 : Graphique présentant la répartition en nombre des échantillons provenant des différents districts de la province de Hanoi, établi à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, juillet 2005.
- Graphique n°4 : Graphique présentant la répartition des échantillons douteux, en fonction du sexe des patients, établi selon l'analyse des fiches épidémiologiques, septembre 2005
- Graphique n°5 : Graphique représentant la répartition des échantillons douteux selon l'âge des patients, établi à partir des fiches épidémiologiques, septembre 2005
- Graphique n°6 : Graphique présentant le pourcentage d'échantillons douteux dans la province de Hanoi et les autres, établi à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, septembre 2005.
- graphique n°7 : Graphique présentant la répartition des cas douteux dans les différents districts de la province de Hanoi, établit à partir de l'analyse des fiches épidémiologiques, octobre 2005

BIBLIOGRAPHIE

1. AVERY SW, UNDEEN AH, The isolation of microsporidia and other pathogens from concentrated ditch water. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 1987, 3, 54-58
2. BALBIANI G. Sur les microsporidies ou sporogspemie des articles, *C.R., Acad. Sci.* , 1882, 95, 1168-1171
3. BETTENS¹ *et al.* Les infections à microsporidies, *Louvain med.*, 1999, 118: 446-456.
4. BICART SEE A., MASSIP P., LINAS MD, DATRY A. Successful treatment with nitazoxanide of *Enterocytozoon bienewisi* microsporidiosis in a patient with AIDS. *Antimicrob Agents Chemothe.*, 2000 Jan;44(1):167-8
5. BIRTHISTLE K., MOORE P., HAY P., Microsporidia: a new sexually transmissible cause of urethritis. *Genitourin. Med.*, 1996, 72, 445.
6. BLACK S.S.*et al.*, *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), *Vet.Patho.*34,189-198.
7. BORNAY-LLINARES FJ. *et al.* Immunologic, microscopic and molecular evidence of *Encephalitozoon (septata) intestinalis* infection in mammals other than humans. *J Inf Dis*, 1998, 820-826.
8. BRYAN. R.T., SCHWARTZ. D.A. Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp., 1999, 502–516.
9. BRYAN R.T., Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS. *Prog. Clin. Parasitol.*, 1991, 2, 1–126.
10. BUCKHOLT M.A. *et al.* Prevalence of *Enterocytozoon bienewisi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 2595–2599.

11. CALI A., TAKVORIAN P, Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 1999, pp. 85–128.
12. CANNING, E.U., VAVRA J.. *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, New York, pp., 1986, 1–289.
13. CANNING, E.U., VAVRA, J. Phylum microsporidia. In: Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P. (Eds.), *The Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd ed. Society of Protozoologists, Lawrence, KS, pp., 2000, 39–126.
14. CARVILLE A., MANSFIELD K., WIDMER G., LACKNER A., KOTLER D., WIEST P., GUMBO T., SARBAH S., TZIPORI S., Development and application of genetic probes for detection of *Enterocytozoon bienersi* in formalin-fixed stools and in intestinal biopsy specimens from infected patients, *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 1997, 4 : 405-408.
15. CAVALIER SMITH T. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.*, 1998, 73: 203-266.
16. CHOKEPPHAIBULKIT K *et al.* Intestinal parasitic infections among human immunodeficiency virus-infected and -uninfected children hospitalized with diarrhea in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2001 Dec;32(4):770-5.
17. CHUPP G.L., *et al.* Myositis due to Pleistophora (Microsporidia) in a patient with AIDS, *Clin. Infect. Dis.*, 1993, 16, 15-21
18. CLOUTIER C. Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In *La lutte biologique*, sous la direction de C. Vincent et D. Coderre, Québec, Canada: Gaétan Morin éditeur ltée 1992, p.19-88. Chicoutimi.
19. CONTEAS CN., FU CS., LA RIVIERE MJ., Successful treatment of idiopathic colitis and proctitis using thalidomide in persons infected with human immunodeficiency virus, *AIDS Patient Care STDS*. 1998 Dec;12(12):903-6
20. CONTEAS C.N *et al.*, Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 2000, 63, 121-127.

21. CORCORAN G.D., ISAACSON J.R., DANIELS C., CHIODINI P.L.,
Urethritis associated with disseminated microsporidiosis: clinical response to albendazole. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, 22, 592–593.
22. COTTE L. *et al.* Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.*, 1999, 180, 2003–2008.
23. DAVID F *et al.* Detection and species identification of intestinal microsporidia by polymerase chain reaction in duodenal biopsies from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 1996 Oct;174(4):874-7.
24. DEL AGUILA C, *et al.* Identification of *Enterocytozoon bienewisi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis, *J Clin Microbiol.*, 1997 Jul; 35(7):1862-6.
25. DEL AGUILA C. *et al.* *Enterocytozoon bienewisi* in animals : rabbits and dogs as new hosts. *J Euk Microbiol*, 1999, 8S-9S.
26. DELUOL AM et CENAC J . Les microsporidiose *microsporidiosis*, *Ann Biol Clin*, 1994, 52, 37-44.
27. DENGJEL B : Zoonotic potential of *Enterocytozoon bienewisi*, 2001.
28. DESPLAZES , MATHIS A; WEBER R, Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib. Microbiol*, 2000, 6, 236-260.
29. DESPORTES I. *et al.* Occurrence of a new microsporidian : *Enterocytozoon bienewisi* n.g., n.sp. in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool* , 1985, 250-254.
30. DESPORTES I. Evolution de la notion de spécificité parasitaire, conférence « *Evolution des parasites et des relations hôtes parasites* » à l'école doctorale, 2-3-4 mai 2001.
31. DIDIER ES *et al.*, Isolation of a new human microsporidian *Encephalitozoon hellem* from three AIDS patients with keratoconjunctivitis, *J. Infct. Dis.*, 1991, 163, 617-621.
32. DIDIER ES. Effects of albendazole, fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1997, 41, 1541-1546.

33. DIDIER ES. *et al.* Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*, 2000, 709-720.
34. DIDIER ES.*et al.*: Epidemiology of microsporidiosis, sources and modes of transmission, *Veterinary Parasitology* 126, 2004, 145-166.
35. DIDIER ES : Microsporidiosis an emerging and opportunistic infection in humans and animals, *Acta Tropica*, 2005, 61-76.
36. DOWD SE, GERBA CP, PEPPER IL. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl. Environ. Microbiol*, 1998, 64, 3332-3335.
37. FOUORAINE NA *et al.*Improvement of chronic diarrhoea in patients with advanced HIV-1 infection during potent antiretroviral therapy, *AIDS*. 1998 Jan 1;12(1):35-41.
38. FOURNIER S.*et al.* Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* , 2000, 29, 95–100.
39. FRANZEN C, MULLER A, Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, 12, 243-285.
40. FRANZEN C, MULLER A.,. Cryptosporidia and microsporidia–waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, 34, 245–262.
41. GARCIA L.S.. Laboratory identification of the microsporidia. *J. Clin. Microbiol.* , 2000, 40, 1892–1901.
42. GUMBO T, HOBBS RE, CARLYN C, HALL G, ISADA CM. Microsporidia infection in transplant patients, 1999. *Transplantation* 67, 482-484.
43. M. HARO *et al.*, First Detection and Genotyping of Human-Associated Microsporidia in Pigeons from Urban Parks, *Appl Environ Microbiol*. 2005 June; 71(6): 3153–3157.
44. HARTSKEERL R.A. *et al.*, Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis*, Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110(5Pt3), 1995, 277-285.

45. HAUTVAST JL, TOLBOOM JJ, DERKS TJ, BECKERS P, SAUERWEIN RW. Asymptomatic intestinal microsporidiosis in a human immunodeficiency virus-seronegative, immunocompetent Zambian child, *Pediatr. Infect. Dis.*, 1997, J. 16, 415-416.
46. HUTIN Y.J. Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. *J. Infect. Dis.*, 1998, 178, 904-907.
47. IGNATIUS R, A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens, *J Clin Microbiol.* 1997 Feb;35(2):446-9.
48. KATZWINKEL S, LOSHER T, RINDER H: Direct amplification and differentiation of Microsporidia species in clinical samples. *Zbl. Bakt.*, 1997, 286, 231-232.
49. KEELING PJ, FAST NM, Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites, *Annu Rev Microbiol.*, 2002 ;56:93-116
50. KOKOSKIN E *et al.* Modified technique for efficient detection of microsporidia, *J Clin Microbiol.* 1994 Apr;32(4):1074-5.
51. KOTLER DP, ORENSTEIN JM., Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol*, 1994;89:540-546
52. KOTLER D.P., ORENSTEIN J.M., Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv. Parasitol.* 1998, 40, 321-349.
53. KOTLER D. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis.* Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 1999, pp. 258-292.
54. KOUDELA B, KUCEROVA S, HUDCOVIC T; Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol (Praha)*, 1999, 45, 149-155.
55. KUCEROVA-POSPISILOVA Z, DITRICH O. The serological surveillance of several groups of patient using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E.*

- cuniculi antibodies to microsporidia in patients. *Folia Parasitol. (Praha)*, 1998, 45, 108-112.
56. LARSSON JL, Molecular versus morphological approach to microsporidian classification, *Folia Parasitol (Praha)*. 2005 May;52(1-2):143-4.
57. LEDFORD D.K., OVERMAN M.D., GONZALVO A., CALI A., MESTER S.W., LOCKEY R.F., Microsporidiosis myositis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 1985, 102, 628–630.
58. LEVINE ND *et al.* A newly revised classification of the protozoa, *J. Protozool.*, 1980, 27, 37-58.
59. LEWIS NL *et al.*, Bilateral microsporidial keratoconjunctivitis in an immunocompetent non-contact lens wearer. *Cornea* 22, 2003, 374-376.
60. LI X, PALMER R, TROUT JM, Fayer R. Infectivity of microsporidia spores stored in water and environmental temperatures, 2003. *J Parasitol.*, 88, 812-813.
61. LIGUORY O., DAVID F., SARFATI C., SCHUITEMA AJR., HARTSKEERL RA., DEROUIN F., MODAI J., MOLINA JM. Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis* using polymerase chain reaction in stool specimens, 1997, *AIDS*, 11 : 723-726.
62. LIGUORY O, FOURNIER S, SARFATI C, DEROUIN F, MOLINA JM., Genetic homology among thirteen *Encephalitozoon intestinalis* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis, *J Clin Microbiol.* 2000 Jun; 38(6):2389-91.
63. LORES *et al.* Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienewisi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain, 2002. *Clin Infect. Dis*, 34, 918-921.
64. LOPEZ-VELEZ R. Practical advice for the prevention of infectious diseases to travellers of risk areas, *Rev Clin Esp.* 2001 May; 201(5):272-8.
65. MAC DOUGALL *et al.* Incidental finding of a microsporidian parasite from AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31, 436-439.
66. MATHIS A. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Intern. J. Parasitol.*, 2000, 795-804.

67. MOHINDRA JM *et al.* Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient, *Transpl. Infect. Dis.*, 2002, 4, 102-107.
68. MOLINA JM. *et al.*, Agence Nationale de Recherche sur le SIDA 090 Study group, Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis, *N. Engl.J.Med.*, 2002, 346, 1963-1969.
69. MOURA H *et al.*, A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections, *Arch Pathol Lab Med.* 1997 Aug;121(8):888-93.
70. MULLER A *et al.* Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 1630-1632.
71. MULLER-DOBLIES UU. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Vet Parasitol.*, 2002, 107, 279-285.
72. NAGELI K . *et al.* Uber die neue Krankheit die Seidenraupe unde verwandet Organismen, *Bot. Zeitung.*, 1857, 15, 760-761.
73. OKHUYSEN P.C., Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clin. Infect. Dis.* 1, 2001, 110–114.
74. OMBROUC C *et al.*, Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients, *J Clin Microbiol.* 1997 Mar; 35(3):652-5.
75. ORLANDI PA, LAMPEL KA. Extraction free, filter based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa, 2000, 38, 2271-2277.
76. POINAR, G. O. *et G. M. Thomas.* Laboratory guide to insect pathogens and parasites, Plenum Press, New York, 1985, P. 329.
77. RAYNAUD L. *et al.* Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J. Clin. Micobiol.* 1998, 36, 37-40.

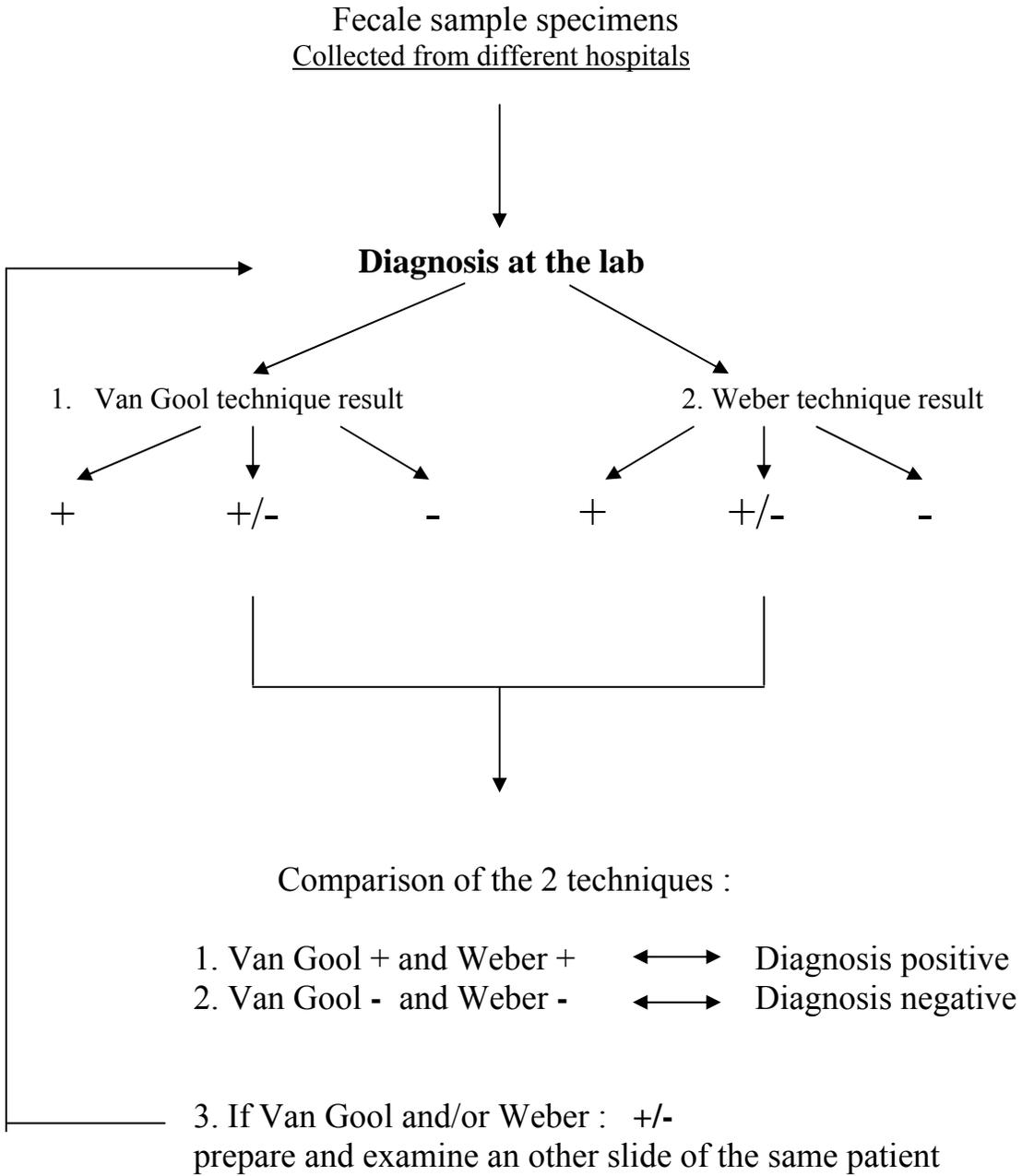
78. SANDFORD J., HANNEMAN A., GELDERBLOM H., STARK K., OWEN RL., RUF B. Enterocytozoon bienewsi infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus, Clin. Infect. Dis., 1994, 19 : 514-516.
79. SARFATI C *et al.*, Prevalence of the intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon : a cross-sectional study, Am. Trop. Med. Hyg, 2006, 74(1), 162-164
80. SHADDUCK JA. Nosema cuniculi in vitro isolation. Science, 1969, 166, 516-517.
81. SHADDUCK JA, POLLEY MB, Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of Encephalitozoon cuniculi. J Protozool., 1978; 25(4):491-6
82. SCHWARZ D.A., VISVESVARA G., WEBER R., BRYAN R.T., Male genital tract microsporidiosis and AIDS: prostatic abscess due to *Encephalitozoon hellem*. J. Eukaryot. Microbiol., 1994,4, 61S.
83. SLIFKO TR., SMITH HV, ROSE JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int. J. Parasitol., 2000, 30, 1379-1393.
84. SOBOTTKA J., Nachwachsende Rohstoffe in Reibbelägen. Technik für den Menschen im Einklang mit der Natur, 1995, Heft 3/95, S. 24-25.
85. SPARFEL J.M, Diagnostic parasitologique des microsporidioses intestinales au CHU de Nantes : *Enterocytozoon bienewsi*, *Septata intestinalis*, 1996, Thèse pharmacie
86. SPARFEL J.M., SARFATI C., LIGUORY O., CAROFF B., DUMOUTIER N., GUELIO, B., BILLAUD E., RAFFI F., MOLINA J.M., MIEGEVILLE M., DEROUIN F.,. Detection of microsporidia and identification of *Enterocytozoon bienewsi* in surfacewater by filtration followed by specific PCR. J. Eukaryot. Microbiol, 1997, 44, 78S.
87. SPRAGUE V, BECNEL JJ. Note on the author-name-date combination for the taxon microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a phylum, 1998, 71, 91-94.
88. SULAIMAN I.M., Fayer, R., Lal, A.A., Trout, J.M., Schaefer III, F.W., Xiao, L., Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor

- host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 4495–4501.
89. SULAIMAN I.M., Fayer, R., Yang, C., Santin, M., Matos, O., Xiao, L., Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol. Res.*, 2004, 92, 328–334.
90. THIELMAN NM., GUERRANT RL. Persistent diarrhea in the returned traveler. *Infect. Dis. Clin. North Amer.*, 1998, 12, 489-501.
91. THURSTON-ENRIQUEZ JA et al., Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production, *J Food Prot.* 2002 Feb;65(2):378-82
92. TUNWINE J.K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, D.E., Buckholt, M.A., Tzipori, S., *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002, 67, 299–303.
93. TUZET O., MAURAND J., FIZE A., MICHEL R., FENWICK B., Proposition d'un nouveau cadre systématique pour les genres de microsporidies. *Compte rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 1971, 272 : 1268-1271.
94. VALPERGA S.M., de Jogna Prat, S.A., de Valperga, G.J., Lazarte, S.G., de Trejo, A.V., Diaz, N., Huttman, H.M., Microsporidian spores in the stool specimens of toddlers, with or without diarrhea, from Tucuman. Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, 1999, 31, 157–164.
95. VAN GOOL T, 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.
96. VAN GOOL T., BIDERRE C., DELBAC F., WENTINK-BONNEMA E., PEEK R., VIVARES C.P., Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Infect. Dis.*, 2004, 189, 2243–2249.
97. VAVRA J. Structure of the microsporidia, in : Wittner, M., Weiss L (eds), *The microsporidia and microsporidiosis*, American Society of Microbiology, Washington, DC, pp.7-84.

98. VOSSBRINCK *et al.*. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient Eukaryotes, 1987, *Nature* 326, 411–414.
99. WANACHIWANAWIN D. *et al.* Intestinal microsporidiosis in HIV infected patients with chronic diarrhea in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998, 29(4):767–71.
100. WANACHIWANAWIN D. *et al.*, Intestinal microsporidiosis in HIV-infected children with diarrhea, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002 Jun;33(2):241-5.
101. WEBER R *et al.*, 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.
102. WEBER R *et al.* Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib. Microbiol.*, 2000, 6, 166-192.
103. WEISS LM & VOSSBRINCK CR. Microsporidiosis : molecular and diagnostic aspects. *Adv Parasitol*, 1998, 351-395.
104. WICHRO E *et al.*: Microsporidiosis in travel associated chronic diarrhea in immune competent patients, Août 2005.
105. WITTNER M., Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. In : Wittner M., Weiss L.(Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. American society of Microbiology, Washington DC, pp 1-6.
106. WUHIB T *et al.*, Cryptosporidial and microsporidial infections in human immunodeficiency virus-infected patients in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 1994 Aug;170(2):494-7;
107. ZHU X. *et al.* Small subunit rRNA sequence of *Enterocytozoon bieneusi* and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction, 1993, *J. Infect. Dis.* 168 : 1570-1575.
108. ZIERT ET GILL Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent-antibody assay using whole-cell antisera to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 3071-3074, Vol 31, No. 11.

ANNEXES

1. Microsporidies study



2. Colouring solutions preparation

1. Van Gool coloration (IF)

□ PBS solution :

Take one bottle of PBS powder and put it in 1 L of sterilised water

□ Evans' blue solution :

- Weigh 0.5g of Blue Evans' powder on a balance
- Put it in 100 mL of PBS solution
- Mix it for 30 sec
- Keep it in darkness before using it

2. Weber coloration

□ Trichrome solution :

- Weigh with accuracy one by one
 - . 6 g of Chromotrope 2 R
 - . 0.15 g of “ Vert Lumiere”
 - . 0.7 g of Phosphotungstique Acid powder
- Put them in a bottle
- Add it 3 mL of Icy Acetic Acid very slowly, and in a ventilation area
- Cover all the bottle with some alu paper (to protect solution from the light)
- Wait for 30 min
- Add it slowly 100 mL of sterilised water
- Mix it with magnetic shaker for 2 hours

□ Acetic alcohol

Take 5 mL of Acetic Acid and put it in 995 mL of Ethanol 90.

3. Microsporidies slides preparation

Fecale sample HIV +

- . Take 1 tube with 1 mL saline buffer with formalin 10 %
- . Add 1 g of fecael specimen
- . Mix it with the vortex for 30 sec
- . Name the solution : Tube A

WEBER

- . Take 10 uL from tube A
- . Put on a slide
- . Spread it on to 1 cm
- . Let it dry at room temperature for 10 min
- . Plunge it in a methanol jar (25 ml) for 5 min to fix it

- . With the rest of the tube A :
 - Add 4 mL of sterilised water
 - Mix it with the vortex for 30 sec
 - Filter in a other tube with 2 layers of gauze
 - Discard the filter

VAN GOOL (= IF)

- . Take 20 uL from the filtered liquid
- . Put on a slide
- . Do not spread it
- . Let it dry at the room temperature for 10 min
- . Plunge it in a methanol jar (25 ml) for 2 min to fÜx it

Then put the slides in a freezer if you can not color them immediatly

4. Van Gool Technic = IF

Object : Microsporidies coloration with an immunofluorescence technique

Reagents:

- FUNGIQUAL (UVIBIO)
- PBS solution (pH : 7,5)
- EVANS' Blue solution

Slide preparation :

1. Take the tube with solution A
2. Add it 4 mL of sterilised water
3. Filter in a new tube with 2 layers of gauze
4. Discard the filter
5. Put 20 uL from the filtered liquid on a slide
6. Do not spread it
7. Let it dry at the room temperature for 10 min
8. Plunge it in a methanol jar (25 mL) for 2 min to fix it
9. Let it dry at the room temperature for 10 min

Coloration :

1. Add 1 drop of UVIBIO and make sure that it cover all the spot
2. Let it dry for 10 min in darkness
3. Rinse 2 times the slide with PBS solution (25 mL) containing in 2 differents jars
4. Plunge it in EVANS' blue jar for 30 sec
5. Rinse 2 times the slide with PBS solution (25 mL) containing in 2 differents jars
6. Let dry it at room temperature in darkness

Examination : . Objective 100 with oil

. **Fluorescence microscope**

Store slides in darkness if you can not analyse them immediately

5. Weber technique

Object : Microsporidies coloration

Reagents : Trichrome solution

Method :

1. Take 1 tube with 1 ml saline buffer with formolin 10 %
2. Add 1 g of fecael specimen
3. Mix it with the vortex for 30 sec : = Solution A
4. Take 10 uL of solution A
5. Put on a slide
6. Spread it onto 1 cm
7. Plunge it in a methanol jar (25 mL) for 5 min to fix it

Coloration :

1. Plunge it in trichrome solution jar for 90 min
2. Rince 4 times in plunging in water jars
3. Dip it in acetic alcohol jar for 10 sec
4. Drain it
5. Then dehydrate in 4 successives jars and drain it between each jar :

↓

Ethanol 95	30 sec
Ethanol 95	5 min
Ethanol 100	10 min
LMR or Toluene	10 min

6. Let it dry at room temperature for 10 min

Examination : Objectif 100 with oil

Microsporidies appear pink on a green background

7. Diagnosis questionnaire for laboratory

Reference :

--	--	--

Year Month N° Patient

Laboratory reference :

. Fecale sample date :

Hospital :

. Technic date at the laboratory

Identification

. Name :

. Sex :

. Date of birth :

. Occupation :

. Address :

Clinic

. Immunize status : HIV

Unknown

CD4 rate

. Clinic signs :

- Fever :

- Others :

- Diarrhoea :

- Sinutisis :

Fecale specimen analysis

. Macroscopic :

- Appearance :

- Colour :

. Microscopic :

- Direct examination :

- Weber :

- Fluo :

→ **Result PCR :**

- *E. bienensi* :

- *E. intestinalis* :

- Autres :

Epidemiology

Comments : contact with animals, diet, social class...

8. Fiche épidémiologique du 1^{er} cas positif à *Enterocytozoon bienewsi*

Diagnosis questionnaire							
Reference :							
<table border="1" style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30px; text-align: center;">04</td> <td style="width: 30px; text-align: center;">11</td> <td style="width: 30px; text-align: center;">51</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">Year</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">Month</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">N° patient</td> </tr> </table>	04	11	51	Year	Month	N° patient	
04	11	51					
Year	Month	N° patient					
Laboratory reference : <input style="width: 50px;" type="text"/>	. Fecale sample date : 10.11.04						
Hospital : Military Institute	. Technic date at the laboratory : 22.11.04						
Identification							
. Name : XXX	. Date of birth : 34 years						
. Sex : M	. Address : Hova Park district						
. Occupation : none							
Clinic							
. Immunize status : HIV <input checked="" type="checkbox"/>	Unknown <input type="checkbox"/> CD4 rate 75						
. Clinic signs :	. Others : Condidose buccale						
- Fever : ✓							
- Diarrhoea : ✓							
- Sinusitis :							
Fecale specimen analysis							
. Macroscopic :							
- Appearance : molle non liquide							
- Colour : jaune clair							
. Microscopic :	→ Result PCR :						
- Direct examination :	- <i>E. bienewsi</i> : ⊕						
- Weber : ⊕	- <i>E. intestinalis</i> :						
- Fluo : ⊕	- Autres :						
Epidemiology							
Comments : contact with animals, diet, social class...							

9. Poster présenté au PHARO et RICAI

Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bieneusi*, isolated from HIV-Infected patients in Hanoi, VietNam

Logo
CHU

Espern Anne¹, Lejeune Anne¹, Phung Dac Cam², Miegerville Michel¹

¹Laboratory of Parasitology and Mycology, Nantes University Hospital (France), ²National 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⁽¹⁾. 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 bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*. Infections by *E. bieneusi* in HIV-negative patients remains rarely reported⁽²⁾ but to date, *E. bieneusi* is still the most common species involved in human infections. Prevalence of microsporidiosis in human range from 2% to 52%⁽³⁾ 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 different 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

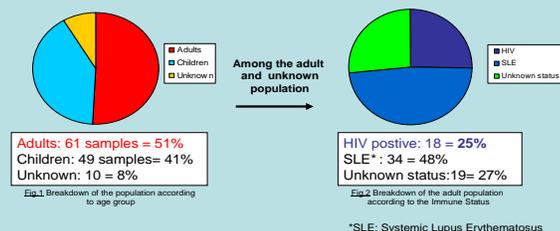
All specimens collected provided from patients whose age ranged from 1 to 75 years old.

METHODS

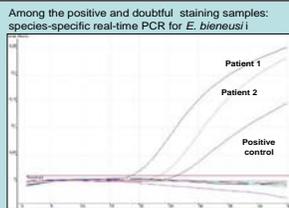
- All samples were examined microscopically for microsporidian spores, in Hanoi, using two staining methods : Uvitex 2B⁽⁴⁾ and the modified trichrome Weber⁽⁵⁾.
- All positive or doubtful samples by microscopy were processed, in Nantes, for *E. bieneusi* species-specific real-time PCR which consist in :
 - ✦ DNA extraction according to a silica-based method (QIAmp[®] DNA Stool Mini Kit, QIAGEN)
 - ✦ Amplification on a Rotor-Gene 3000[®] (Corbett Research) using two primer targeting a 180 bp of a highly conserved region of *E. bieneusi* ssurRNA :
 - EB1 5'-CGACAGCTGTGTGTGAGAATAC-3'
 - EB5 5'-CAACGAATGACTTGACCTGGTAA-3'
 - ✦ Detection ensured thanks to a specific *Taqman* probe
 - EBS2 5'-FAM GCTGCTTAATTTAACTCAACGCGGAAAA TAMRA-3'
- Each samples was tested in duplicate
- Positive, negative and Internal Control (ABSystem[®]) were included into each run

RESULTS

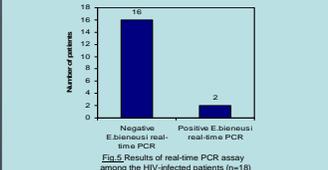
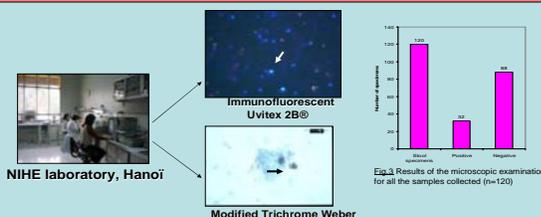
Characteristics of 120 stool specimens tested in this study



Molecular identification of *E. bieneusi* (Nantes)



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



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

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

	Hospital	Sex	Age	Immune Status	CD4/mm3	Uvitex 2B [®]	Weber	real-time PCR <i>E. bieneusi</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. bieneusi*. This is the first report of human microsporidiosis due to *E. bieneusi* 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, unlike Mungthin and al. observations in thai orphanage⁽⁶⁾, **we did not find any *E. bieneusi* in children**. 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. bieneusi*. 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. bieneusi* 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, 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) 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, Orentlicher JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1998.
 (4) van Gool T, Snijders F, Reiss P, Eeftink Schattenkerk JK, van den Bergh Weerman MA, Bantelman JF, Bruns 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(6): 604-6.
 (5) Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorek L, Vivesvara 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.
 (6) Sawanya Leelayoova and al. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* 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 SIDA et les infections chez les immunodéprimés)

10. Publication Elsevier

Nom-Prénoms : Lejeune Anne, Claude, Nicole

Titre de la Thèse : RECHERCHE DE MICROSPORIDIOSSES INTESTINALES A HANOI,
VIETNAM

Résumé de la Thèse : Une étude de dix mois a été mise en place à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie à Hanoi-Vietnam, en collaboration avec le laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes, sur la recherche de microsporidioses intestinales chez l'homme. Elle a porté sur un dépistage de spores de microsporidies en microscopie, par la technique en fluorescence de Van Gool couplée à la méthode au Trichrome modifié de Weber. Cette étude a permis la mise en évidence, chez des patients séropositifs au Vietnam, des deux premiers cas de microsporidioses intestinales confirmés par biologie moléculaire, l'un à *Enterocytozoon bienewisi*, l'autre à *Encephalitozoon intestinalis*. Les échantillons suspects par microscopie optique à hauteur de 32% ont été ramenés au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes, où ils sont analysés en PRC Temps réel.

MOTS CLES :

- Vietnam
 - Enterocytozoon bienewisi
 - Patients diarrhéiques
 - Etude microscopique
 - Encephalitozoon intestinalis - PCR temps réel
-

JURY

PRESIDENT : Mr Alain PINEAU, Professeur de toxicologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

DIRECTEUR DE THESE : Mr Michel MIEGEVILLE, MC de parasitologie
Faculté de Médecine de Nantes

ASSESEURS : Mr Yves-François POUCHUS , Pr. de botanique mycologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

Mme Anne Marie CANTEREAU, pharmacien

13, rue de Châteaubriand, Carquefou

Mme Cécile AMIAUD, pharmacien

Hôtel Bernard, Saint Dolay

Adresse de l'auteur : Lejeune Anne

45, lotissement du clos martin, 56130 NIVILLAC