

## Table des matières

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Table des matières .....                                             | 1  |
| Introduction .....                                                   | 5  |
| Première partie : étude bibliographique .....                        | 7  |
| 1 Le parasite <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....                  | 7  |
| 1.1 Historique .....                                                 | 7  |
| 1.2 Classification .....                                             | 8  |
| 1.2.1 Le phylum Microspora .....                                     | 8  |
| 1.2.2 Origine des microsporidies .....                               | 8  |
| 1.2.3 Souches et caryotypes d' <i>Encephalitozoon cuniculi</i> ..... | 9  |
| 1.3 Morphologie .....                                                | 10 |
| 1.3.1 En microscopie optique .....                                   | 10 |
| 1.3.1.1 A l'état frais .....                                         | 10 |
| 1.3.1.2 Avec coloration .....                                        | 10 |
| 1.3.2 En microscopie électronique .....                              | 11 |
| 1.4 Cycle .....                                                      | 13 |
| 1.4.1 Phase infectieuse .....                                        | 13 |
| 1.4.2 Phase proliférative .....                                      | 14 |
| 1.4.3 Phase de différenciation .....                                 | 15 |
| 2 L'encéphalitozoonose du lapin .....                                | 17 |
| 2.1 Epidémiologie .....                                              | 17 |
| 2.1.1 Epidémiologie descriptive .....                                | 17 |
| 2.1.1.1 Prévalence .....                                             | 17 |
| 2.1.1.1.1 Chez le lapin de laboratoire .....                         | 17 |
| 2.1.1.1.2 Chez le lapin d'élevage .....                              | 17 |
| 2.1.1.1.3 Chez le lapin sauvage .....                                | 18 |
| 2.1.1.1.4 Chez le lapin de compagnie .....                           | 18 |
| 2.1.1.2 Importance économique .....                                  | 18 |
| 2.1.2 Epidémiologie analytique .....                                 | 19 |
| 2.1.2.1 Sources de parasites .....                                   | 19 |
| 2.1.2.2 Modes d'infection .....                                      | 19 |
| 2.1.2.3 Facteurs prédisposants .....                                 | 20 |
| 2.1.2.3.1 Âge .....                                                  | 20 |
| 2.1.2.3.2 Sexe .....                                                 | 20 |
| 2.1.2.3.3 Race .....                                                 | 20 |
| 2.1.2.3.4 Immunocompétence .....                                     | 21 |
| 2.1.2.3.5 Maladie sous-jacente .....                                 | 21 |
| 2.1.3 Epidémiologie synthétique .....                                | 21 |
| 2.2 Symptômes .....                                                  | 22 |
| 2.2.1 Symptômes nerveux .....                                        | 23 |
| 2.2.2 Symptômes rénaux .....                                         | 23 |
| 2.2.3 Symptômes ophtalmologiques .....                               | 24 |
| 2.2.4 Autres symptômes .....                                         | 25 |
| 2.3 Lésions .....                                                    | 25 |
| 2.3.1 Lésions macroscopiques .....                                   | 25 |
| 2.3.2 Lésions histologiques .....                                    | 25 |
| 2.3.2.1 Lésions du système nerveux .....                             | 25 |
| 2.3.2.2 Lésions rénales .....                                        | 26 |

|           |                                                               |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.2.3   | Lésions oculaires .....                                       | 27 |
| 2.3.2.4   | Autres lésions histologiques .....                            | 27 |
| 2.4       | Pathogénie .....                                              | 29 |
| 2.4.1     | Pathogénie générale .....                                     | 29 |
| 2.4.2     | Pathogénie de l'encéphalitozoonose oculaire [49] .....        | 29 |
| 2.5       | Immunité .....                                                | 30 |
| 2.5.1     | Interaction hôte-parasite .....                               | 30 |
| 2.5.2     | Rôle de l'immunité à médiation cellulaire .....               | 31 |
| 2.5.2.1   | Importance de l'immunité à médiation cellulaire .....         | 31 |
| 2.5.2.2   | Rôle des cytokines .....                                      | 31 |
| 2.5.2.3   | Types de lymphocytes T induits .....                          | 31 |
| 2.5.3     | Réponse des lymphocytes T cytotoxiques à l'infection .....    | 32 |
| 2.5.3.1   | Rôle des lymphocytes T CD8+ .....                             | 32 |
| 2.5.3.2   | Régulation des lymphocytes T CD8+ .....                       | 32 |
| 2.5.3.2.1 | Rôle des lymphocytes T CD4+ .....                             | 32 |
| 2.5.3.2.2 | Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$ .....                   | 32 |
| 2.5.4     | Rôle de l'immunité à médiation humorale .....                 | 33 |
| 2.6       | Diagnostic .....                                              | 33 |
| 2.6.1     | Diagnostic différentiel .....                                 | 33 |
| 2.6.1.1   | Diagnostic différentiel des troubles neurologiques .....      | 33 |
| 2.6.1.2   | Diagnostic différentiel des troubles oculaires .....          | 34 |
| 2.6.2     | Méthodes de diagnostic .....                                  | 35 |
| 2.6.2.1   | Sérologie .....                                               | 35 |
| 2.6.2.1.1 | ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) .....               | 35 |
| 2.6.2.1.2 | Immunofluorescence indirecte .....                            | 35 |
| 2.6.2.1.3 | Immunoélectrophorèse .....                                    | 38 |
| 2.6.2.1.4 | Réaction à l'encre de Chine ou Carbon ImmunoAssay (CIA) ..... | 38 |
| 2.6.2.1.5 | Test d'agglutination indirecte .....                          | 38 |
| 2.6.2.1.6 | Avantages et inconvénients des méthodes sérologiques .....    | 39 |
| 2.6.2.2   | Recherche des spores .....                                    | 40 |
| 2.6.2.2.1 | Mise en évidence ante mortem .....                            | 40 |
| 2.6.2.2.2 | Mise en évidence histopathologique .....                      | 40 |
| 2.6.2.3   | Méthodes moléculaires [11] .....                              | 41 |
| 2.6.2.3.1 | Polymerase Chain Reaction (PCR) .....                         | 41 |
| 2.6.2.3.2 | Migration sur gel .....                                       | 41 |
| 2.6.2.3.3 | Autres techniques .....                                       | 41 |
| 2.6.2.4   | Epreuve cutanée .....                                         | 42 |
| 2.7       | Pronostic .....                                               | 42 |
| 2.8       | Moyens de lutte .....                                         | 42 |
| 2.8.1     | Traitement .....                                              | 42 |
| 2.8.1.1   | Élimination du parasite .....                                 | 43 |
| 2.8.1.1.1 | Albendazole .....                                             | 43 |
| 2.8.1.1.2 | Fenbendazole .....                                            | 44 |
| 2.8.1.1.3 | Oxytétracycline .....                                         | 45 |
| 2.8.1.1.4 | Fumagilline .....                                             | 45 |
| 2.8.1.1.5 | Itraconazole .....                                            | 46 |
| 2.8.1.1.6 | Métronidazole .....                                           | 46 |
| 2.8.1.1.7 | Lufénuron .....                                               | 46 |
| 2.8.1.2   | Corticoïdes .....                                             | 46 |
| 2.8.1.3   | Traitement symptomatique .....                                | 47 |

|                                            |                                                                             |    |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.8.1.3.1                                  | Traitement des signes neurologiques .....                                   | 47 |
| 2.8.1.3.2                                  | Traitement de l'incontinence urinaire .....                                 | 47 |
| 2.8.1.3.3                                  | Traitement de l'insuffisance rénale .....                                   | 47 |
| 2.8.1.3.4                                  | Traitement des signes oculaires.....                                        | 48 |
| 2.8.2                                      | Prophylaxie.....                                                            | 48 |
| 2.8.2.1                                    | Prophylaxie sanitaire .....                                                 | 48 |
| 2.8.2.2                                    | Prophylaxie médicale .....                                                  | 49 |
| 3                                          | L'encéphalitozoonose chez les autres animaux et chez l'homme.....           | 50 |
| 3.1                                        | L'encéphalitozoonose chez les animaux .....                                 | 50 |
| 3.1.1                                      | L'encéphalitozoonose chez les rongeurs.....                                 | 50 |
| 3.1.1.1                                    | Chez la souris .....                                                        | 50 |
| 3.1.1.2                                    | Chez le cobaye .....                                                        | 51 |
| 3.1.2                                      | L'encéphalitozoonose chez les carnivores .....                              | 51 |
| 3.1.3                                      | L'encéphalitozoonose chez les primates non humains .....                    | 52 |
| 3.1.4                                      | L'encéphalitozoonose chez les oiseaux.....                                  | 53 |
| 3.1.5                                      | L'encéphalitozoonose chez les autres animaux .....                          | 53 |
| 3.2                                        | L'encéphalitozoonose chez l'homme.....                                      | 54 |
| 3.2.1                                      | Les agents de microsporidioses chez l'homme .....                           | 54 |
| 3.2.2                                      | Symptômes induits par <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....                 | 54 |
| 3.2.3                                      | Potentiel zoonotique.....                                                   | 55 |
| Deuxième partie : étude expérimentale..... |                                                                             | 57 |
| 1                                          | Objectifs de l'enquête.....                                                 | 57 |
| 2                                          | Matériels et méthode .....                                                  | 58 |
| 2.1                                        | Nature des prélèvements .....                                               | 58 |
| 2.2                                        | Lieux et durée des prélèvements .....                                       | 58 |
| 2.2.1                                      | Docteur Jean-François QUINTON.....                                          | 58 |
| 2.2.2                                      | Docteur Didier BOUSSARIE.....                                               | 58 |
| 2.2.3                                      | Docteur Christophe BULLIOT .....                                            | 59 |
| 2.3                                        | Réalisation et stockage des prélèvements .....                              | 59 |
| 2.4                                        | Recueil des commémoratifs .....                                             | 59 |
| 2.5                                        | Réalisation des analyses .....                                              | 61 |
| 2.5.1                                      | Immunofluorescence indirecte .....                                          | 61 |
| 2.5.2                                      | Dot- Blot.....                                                              | 61 |
| 2.5.2.1                                    | Principe.....                                                               | 61 |
| 2.5.2.2                                    | Réalisation.....                                                            | 62 |
| 2.5.2.3                                    | Interprétation .....                                                        | 64 |
| 2.6                                        | Répartition en lots .....                                                   | 64 |
| 2.6.1                                      | Par symptômes .....                                                         | 64 |
| 2.6.1.1                                    | Symptômes évocateurs d'encéphalitozoonose.....                              | 64 |
| 2.6.1.2                                    | Différents groupes de symptômes cliniques.....                              | 65 |
| 2.6.2                                      | Par sexe .....                                                              | 65 |
| 2.6.3                                      | Par âge.....                                                                | 65 |
| 2.7                                        | Analyse des résultats .....                                                 | 66 |
| 2.7.1                                      | Calcul de la prévalence de l'échantillon et extension à la population ..... | 66 |
| 2.7.2                                      | Comparaison des différents lots .....                                       | 66 |
| 2.7.3                                      | Comparaison des différents tests.....                                       | 66 |
| 3                                          | Résultats .....                                                             | 67 |
| 3.1                                        | Séroprévalence pour <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....                   | 67 |
| 3.1.1                                      | Parmi les lapins tout venant .....                                          | 67 |
| 3.1.2                                      | Répartition par symptômes.....                                              | 67 |

|         |                                                                        |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2.1 | Symptômes évocateurs d'encéphalitozoonose .....                        | 67 |
| 3.1.2.2 | Différents groupes de symptômes cliniques.....                         | 67 |
| 3.1.3   | Répartition par sexe.....                                              | 69 |
| 3.1.4   | Répartition par âge .....                                              | 69 |
| 3.2     | Comparaison des différents tests.....                                  | 71 |
| 3.2.1   | Comparaison Immunofluorescence / Dot-Blot sur protéines totales .....  | 71 |
| 3.2.2   | Comparaison Immunofluorescence / Dot-Blot sur protéines purifiées..... | 72 |
| 4       | Discussion .....                                                       | 73 |
| 4.1     | Protocole.....                                                         | 73 |
| 4.1.1   | Nature des prélèvements .....                                          | 73 |
| 4.1.2   | Choix des analyses .....                                               | 73 |
| 4.1.3   | Choix des animaux .....                                                | 73 |
| 4.1.4   | Nombre de prélèvements.....                                            | 74 |
| 4.1.5   | Recueil des commémoratifs .....                                        | 74 |
| 4.1.6   | Répartition en lots .....                                              | 75 |
| 4.2     | Résultats .....                                                        | 75 |
| 4.2.1   | Séroprévalence pour <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....              | 75 |
| 4.2.2   | Comparaison des différents tests.....                                  | 76 |
| 4.2.2.1 | Choix de l'antigène .....                                              | 76 |
| 4.2.2.2 | Intérêt pratique en clientèle .....                                    | 76 |
| 4.2.2.3 | Critères de validité des Dot-Blot.....                                 | 77 |
|         | Conclusion.....                                                        | 79 |
|         | Bibliographie.....                                                     | 81 |

## Introduction

Le praticien vétérinaire est susceptible de rencontrer quotidiennement un petit mammifère comme un rongeur ou un lagomorphe. Ces nouveaux animaux de compagnie (NAC) prennent une part de plus en plus importante en médecine vétérinaire mais les praticiens sont parfois déroutés par ces animaux. Ceci est principalement dû au peu de connaissances qu'ils possèdent sur ces animaux. C'est pourquoi il est indispensable de s'intéresser à ces animaux et en particulier au lapin qui est le nouvel animal de compagnie le plus fréquemment présenté à la consultation.

Le parasite *Encephalitozoon cuniculi* est une microsporidie connue depuis près d'un siècle. Il est très étudié en particulier chez le lapin de laboratoire car il interfère avec les expérimentations. Cependant, la recherche n'a longtemps pas porté d'intérêt à la maladie qu'il provoque, l'encéphalitozoonose. Ainsi, on a plutôt cherché à éliminer les lapins porteurs plutôt qu'à les soigner. Mais avec les lapins de compagnie, le problème est totalement différent puisqu'une valeur affective vient s'ajouter. La gestion de la maladie est donc totalement modifiée d'autant plus que l'encéphalitozoonose est une zoonose qui prend de plus en plus d'importance chez les populations immunodéprimées et en particulier les humains porteurs du Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH). L'encéphalitozoonose du lapin de compagnie a donc une importance vétérinaire mais aussi médicale. C'est pourquoi il convient de connaître quels sont les animaux malades et pourquoi.

Après une étude bibliographique s'intéressant au parasite *Encephalitozoon cuniculi* et à la maladie qu'il provoque chez le lapin mais aussi chez les autres animaux, nous présenterons notre travail de recherche sur la séroprévalence d'*Encephalitozoon cuniculi* chez le lapin de compagnie et sur la mise en évidence d'éventuels facteurs favorisants. Un nouveau test diagnostique sera également comparé à un test utilisé couramment.



# Première partie : étude bibliographique

## 1 Le parasite *Encephalitozoon cuniculi*

### 1.1 Historique

Les microsporidies sont des organismes unicellulaires parasites intracellulaires obligatoires qui ont d'abord été reconnus comme cause de pébrine, maladie du ver à soie caractérisée par l'apparition de taches sombres sur le tégument (pebre = poivre). La pébrine a pratiquement détruit l'industrie du ver à soie au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle et, depuis, les microsporidioses ont causé de sérieuses pertes économiques en apiculture et pisciculture [10].

Comme son nom l'indique, *Encephalitozoon cuniculi* affecte essentiellement le lapin et c'est chez cet animal que le parasite a été décrit pour la première fois par LEVADITI, NICOLAU et SCHOEN en 1923 [31]. Les signes cliniques associés avaient été décrits précédemment par WRIGHT et CRAIGHEAD en 1922 [50], mais les signes semblaient associés au virus de la « paralysie infantile humaine » et transmis par des puces [50].

De nombreux noms successifs lui ont été attribués. Initialement nommé *Encephalitozoon cuniculi* par ces découvreurs, le parasite a été nommé de 1964 à 1970 *Nosema cuniculi* [1, 6, 13, 32, 36] suite à une erreur de classification. Au début des années 1970, le nom original *Encephalitozoon cuniculi* a recommencé à être utilisé [36]. Il a également porté les noms de *Nosema muris* [13, 32], *Glugea lyssae* [13], *Encephalitozoon negrii* [32]. Ces deux derniers lui ont été accordés car le parasite a, un temps, été considéré comme l'agent de la Rage (en grec lyssa) et confondu aux corps de Negri.

*Encephalitozoon cuniculi* a été relativement peu étudié pendant les 40 à 50 premières années après sa découverte, mais les vétérinaires le reconnaissent comme agent pathogène latent des animaux de laboratoire, particulièrement du lapin. Puis, *Encephalitozoon cuniculi* a été étudié car il interfère avec un grand nombre d'expériences, notamment les recherches sur la poliomyélite et les néoplasies [38]. Les études le concernant se sont cependant multipliées depuis sa description chez des humains immunodéprimés notamment ceux infectés par le VIH.

Son séquençage complet a été achevé en 2001 [24].

## 1.2 Classification

### 1.2.1 Le phylum Microspora

*Encephalitozoon cuniculi* appartient au phylum des Microspora. Les membres de ce phylum sont tous des parasites intracellulaires qui produisent des spores et ont un noyau vésiculaire (en forme d'ampoule). Les spores sont unicellulaires et contiennent un sporoplasme uni ou binucléé qui est injecté dans la cellule-hôte par un appareil extrusif qui a toujours un tubule polaire (ou filament polaire) caractéristique, enroulé dans la spore, ainsi qu'une capsule polaire [10, 26, 32, 46].

Ce phylum comprend deux classes : les *Rudimicrosporea* et les *Microsporea*. La classe des *Microsporea* contient deux ordres : les *Minosporea* et les *Microsporida* [9]. Les *Minosporea* comportent quatre genres, sont plus petites (autour de 1µm) et infectent des Invertébrés. Les *Microsporida* mesurent quelques microns, comportent une centaine de genres et plus de trois mille espèces [30]. Elles infectent essentiellement les arthropodes et les poissons, mais une quinzaine d'espèces peuvent infecter les mammifères [9, 10, 17, 30]. Deux genres de microsporidies, *Encephalitozoon* et *Nosema*, interviennent chez les Vertébrés, et un autre genre, *Thelohania*, est retrouvé chez les Invertébrés et le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*) en France [32].

### 1.2.2 Origine des microsporidies

Les microsporidies sont des eucaryotes unicellulaires parasites intracellulaires obligatoires, traditionnellement considérées comme des protozoaires [46]. Comme elles ne possèdent pas de mitochondries, elles étaient initialement considérées comme ayant divergé avant l'endosymbiose à l'origine des mitochondries [24, 37, 43]. Cependant, cette hypothèse a été remise en cause lors de la découverte de séquences nucléotidiques microsporidiales homologues aux gènes codant pour des protéines mitochondriales [24, 43]. De plus, il existe quelques preuves génétiques et moléculaires qui suggèrent une étroite relation phylogénétique avec les champignons : [37, 43, 46]

- la possession de protéines mitochondriales extrêmement proches de celles des champignons,
- la composition des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  ressemblant à celle des tubulines fongiques,
- la présence de chitine et de tréhalose qui sont aussi des composants des champignons,



- l'analyse phylogénétique de 99 protéines sélectionnées comme des marqueurs adéquates indiquent que les séquences d'*Encephalitozoon cuniculi* à évolution lente sont préférentiellement groupées avec les séquences des champignons.

Les microsporidies semblent donc avoir évolué à partir d'un ancêtre commun aux champignons qui contenait des mitochondries et qui a ensuite perdu ces organelles [36, 43, 46].

### **1.2.3 Souches et caryotypes d'*Encephalitozoon cuniculi***

Plusieurs souches et caryotypes d'*Encephalitozoon cuniculi* ont été décrits : les souches ont été établies à partir du nombre de répétitions de la séquence 5'-GTTT-3' dans le transcrit du gène de l'ARN ribosomal [2, 10, 22, 39] et les désignations caryotypiques sont basées sur la migration sur gel d'électrophorèse dans un champs pulsé [10].

La souche I (qui contient trois fois la séquence 5'-GTTT-3' [2]) / les caryotypes A, B et C infectent naturellement les lapins, les souris et les humains. La souche II / le caryotype F infecte naturellement les renards bleus et les souris. La souche III (quatre répétitions de la séquence [39])/ les caryotypes D et E infectent naturellement les chiens domestiques et les humains. Les souches d'*Encephalitozoon cuniculi* non classées infectent de nombreux mammifères, par exemple les rats, les cobayes, les hamsters, les chevaux, les poules, les visons, les primates non-humains [10, 22]. Aux Etats Unis, les isolats d'humains ont montré des souches III ; cependant, en Europe, les isolats d'humains appartiennent à la souche I [22, 39].

Le génome nucléaire d'*Encephalitozoon cuniculi* est relativement petit,  $2,9 \times 10^6$  paires de bases de nucléotides (comparé aux  $4,7 \times 10^6$  paires de bases de *Escherichia coli* et aux  $6,0 \times 10^9$  paires de bases des cellules somatiques humaines). De plus, les séquences non codantes de l'ADN microsporidien sont relativement rares. Donc, les microsporidies semblent pouvoir encoder l'information nécessaire à l'infection, la réplication et la dissémination d'une manière extrêmement efficace, ce qui suggère que ces parasites sont très adaptés pour survivre chez leur hôte [46].

### **1.3 Morphologie**

Les spores des microsporidies sont caractéristiques : elles sont petites et souvent de forme ovale. Dans le cas d'*Encephalitozoon cuniculi*, les spores mesurent 2,5 x 1,5 µm [1].

#### **1.3.1 En microscopie optique**

##### **1.3.1.1 A l'état frais**

Les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* sont isolées ou regroupées, de façon assez lâche, en pseudo-kystes de 10 à 50 µm dans des macrophages, des monocytes, des cellules nerveuses ou des cellules rénales, au sein d'une vacuole parasitophore [13].

Une vacuole transparente et réfractaire est visible à l'une des extrémités de la spore. En diaphragmant, cette vacuole transparente ou capsule polaire est évidente [1].

Les spores ont une forme droite à légèrement incurvée avec à leurs deux extrémités un bout arrondi, mais l'une des extrémités est un peu plus large que l'autre ; elles sont parfois légèrement plus étroites au centre ou à proximité du centre. Des formes ovales ou rondes peuvent apparaître. Le noyau est compact, rond, ovale ou en forme de bande, mesure ¼ à 1/3 du parasite et n'est pas central [32].

Le tube polaire et la capsule polaire sont difficiles à voir ; dans le passé, cela a conduit les chercheurs à confondre *Encephalitozoon cuniculi* et *Toxoplasma gondii* [13, 32]. Cependant, des différences sont perceptibles : les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* sont plus petites que les bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii* ; les pseudo-kystes, de dimension comparable, sont moins denses que ceux du toxoplasme. De plus, les spores d'*Encephalitozoon cuniculi*, dont la paroi renferme de la chitine, sont fluorescentes en lumière de Wood [13].

##### **1.3.1.2 Avec coloration**

Dans les sections de tissu colorées au Giemsa, les spores apparaissent comme des structures ovales décolorées hormis un spot bleu foncé au centre et formant une barre au travers de la spore. La paroi de la spore est colorée en bleu à la coloration de Gram. Cette coloration est utilisée pour confirmer le diagnostic, surtout quand les spores sont en quantité limitée dans la préparation [1].

Les colorations permettent également de différencier *Encephalitozoon cuniculi* et *Toxoplasma gondii* (Tableau 1).

**Tableau 1 : Colorations permettant d'effectuer un diagnostic différentiel entre *Encephalitozoon* et *Toxoplasma* (d'après [13, 32, 33])**

| Coloration                                                    | Spores d' <i>Encephalitozoon</i>                                     | Bradyzoïtes de <i>Toxoplasma</i>     |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Hématoxyline – éosine                                         | Faiblement colorable, semis de points sombres dans les pseudo-kystes | Modérément colorable (rose – violet) |
| Giemsa                                                        | Bleu brillant                                                        | Mauve                                |
| Acide périodique de Schiff                                    | Rouge (positif)                                                      | Rouge positif                        |
| Hématoxyline ferrique (Weigert)                               | Noir                                                                 | Ne prend pas la coloration           |
| Imprégnation argentique (Wilder)                              |                                                                      | Noir (parois du kyste)               |
| Gram                                                          | Bleu (positif)                                                       | Ne prend pas la coloration           |
| Fuchsine carbolique – bleu de méthylène (Wright et Craighead) | Rouge foncé                                                          | Bleu                                 |

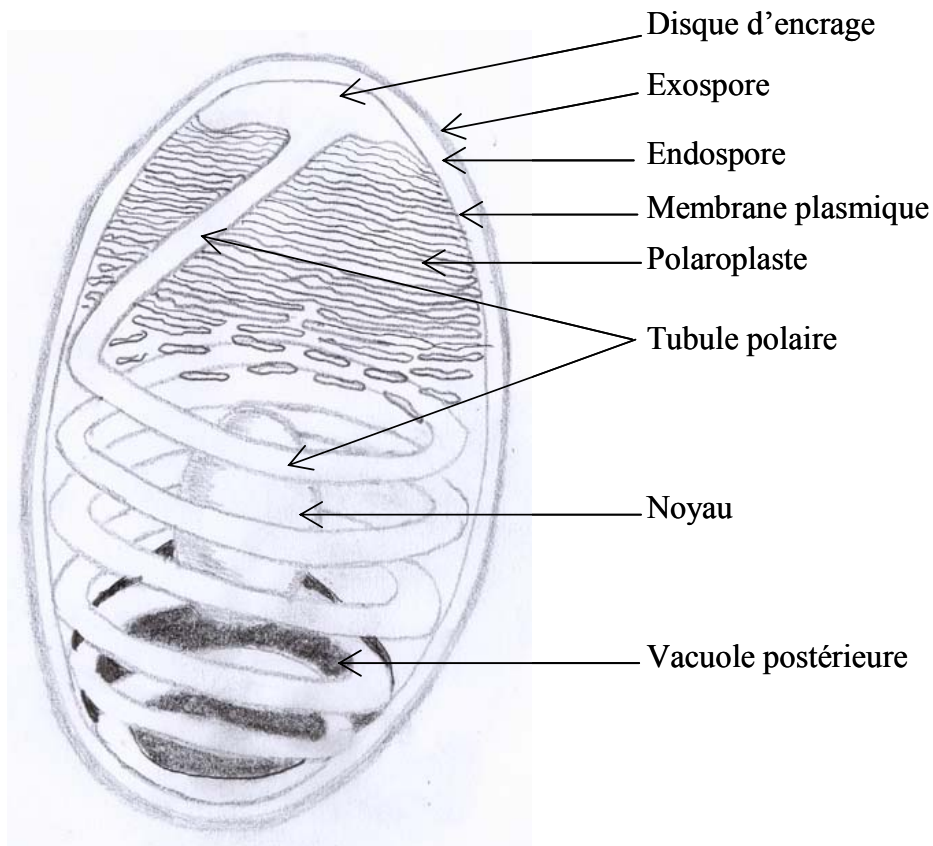
### 1.3.2 En microscopie électronique

[10, 46]

La spore d'*Encephalitozoon cuniculi* est entourée de l'intérieur vers l'extérieur par une membrane plasmique trilaminée interne, par une endospore qui est transparente aux électrons et composée de chitine et par une exospore électrodense composée de glycoprotéine. A l'intérieur de la spore se trouve un noyau central simple (monocaryon) chez *Encephalitozoon cuniculi*, à la différence du genre *Nosema* chez lequel les spores sont binucléées [20]. La spore mature contient une vacuole postérieure distincte, et dans la région antérieure, un disque d'ancrage et un appareil de Golgi atypique appelé polaroplaste. Le filament polaire, tube creux unique aux microsporidies, jaillit du disque d'ancrage et se dispose en couches parallèles et circulaires dans la moitié postérieure de la spore. Les microsporidies contiennent également des ribosomes « procaryote-like » qui sont étroitement associés avec le réticulum endoplasmique réparti de manière diffuse dans le cytoplasme [10]. De plus, comme il a déjà été mentionné, les microsporidies n'ont pas de mitochondries ; elles se sont, au cours de l'évolution, complètement adaptées à la vie parasitaire dans la cellule hôte. Elles dépendent

du métabolisme énergétique de la cellule hôte et elles se développent uniquement en position intra-cellulaire [36, 38]. Un schéma de spore est présenté en figure 1.

**Figure 1 : Schéma d'une spore d'*Encephalitozoon cuniculi***  
(d'après I. WAWRZY尼亚K [46 bis])



La présence ou l'absence de vacuole parasitophore ainsi que le nombre et l'arrangement du filament polaire aident à différencier les espèces du genre *Encephalitozoon* au microscope électronique [46] (Tableau 2).

**Tableau 2 : Différenciation des espèces du genre *Encephalitozoon* à partir de la spore**

| Caractéristiques                                    | <i>Encephalitozoon cuniculi</i>                            | <i>Encephalitozoon hellem</i> | <i>Encephalitozoon intestinalis</i>                            | <i>Enterocytozoon bieneusi</i>                                                          |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Dimensions de la spore en $\mu\text{m}$             | 1,5 x 2,5                                                  | 1,0 x 2,5                     | 1,2 x 2,0                                                      | 0,5 x 1,5                                                                               |
| Nombre de couches du tubule polaire                 | 5-7 (6)                                                    | 4-9 (6)                       | 4-7 (5)                                                        | 4-5 (6)                                                                                 |
| Arrangement du tubule polaire                       | Une rangée                                                 | Une rangée                    | Une rangée                                                     | 2 rangées                                                                               |
| Développement dans le cytoplasme de la cellule-hôte | Vacuole parasitophore                                      | Vacuole parasitophore         | Septum, vacuole parasitophore                                  | Contact direct                                                                          |
| Type de cellules infectées                          | Cellules épithéliales, macrophages, cellules endothéliales | Cellules épithéliales         | Entérocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales | Entérocytes, cellules épithéliales biliaires, pancréatiques, respiratoires, macrophages |

## 1.4 Cycle

[9, 10, 13, 32, 46]

La durée d'évolution du cycle est toujours brève, 24-48h [13, 20], mais elle est liée à plusieurs facteurs extrinsèques : la température ambiante qui influe sur le nombre de spores obtenues, les tissus de l'hôte [9, 13]...

### 1.4.1 Phase infectieuse

Le site d'infection primaire dépend du mode de transmission mais il s'agit typiquement des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal ou respiratoire [10].

La stimulation par un signal environnemental non caractérisé provoque l'extrusion du filament polaire de la spore et l'injection du sporoplasme infectieux dans la cellule-hôte. Bien que l'extrusion du tubule polaire soit considérée comme le premier mécanisme par lequel toutes les microsporidies établissent l'infection intracellulaire, la culture *in vitro* d'*Encephalitozoon* spp suggère que la phagocytose des spores par la cellule-hôte peut aussi être à l'origine de l'infection intracellulaire [46]. Cependant, les parasites sont situés directement dans le cytoplasme et non au sein d'un phagosome, ainsi ils ne peuvent pas être attaqués par les lysosomes cellulaires [9].

L'investigation sur les mécanismes d'infection des microsporidies s'est focalisée sur le filament polaire caractéristique. L'extrusion de ce filament, et par conséquent l'injection du sporoplasme infectant dans une potentielle cellule-hôte, est probablement due, mais c'est une hypothèse, à une augmentation brutale de la pression osmotique (ou un changement de pH [10]), qui résulterait de la fabrication de métabolites du glucose par l'hydrolyse des stocks de tréhalose dans les vacuoles de la spore. Le tréhalose est un disaccharide non réductible du glucose utilisé comme source d'énergie chez les insectes, les nématodes et les champignons mais pas par les mammifères. Il est une cible métabolique potentielle pour contrôler l'infection microsporidienne. *In vitro*, l'extrusion du filament polaire a été améliorée par la présence d'ions calcium dans la cellule et par l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aux cultures ; elle est inhibée par la cytochalasine D, la démécoldine, la nifédipine et l'itraconazole, suggérant que les canaux calcium-dépendant, l'apport d'oxygène, et/ou les éléments du cytosquelette (c'est-à-dire les microtubules, microfilaments) sont impliqués dans ce processus. De plus, l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de l'albendazole, un inhibiteur des microtubules, dans la prévention des infections due à *Encephalitozoon* spp, est une preuve indirecte du rôle des microtubules dans le processus d'extrusion. D'autres investigations en cours se focalisent sur la composition des protéines et l'antigénicité du filament polaire [46].

#### **1.4.2 Phase proliférative**

Une fois dans la cellule-hôte, le sporoplasme déposé se divise par scission binaire (mérogonie), à l'intérieur d'une vacuole parasitophore, en formes prolifératives (mérontes) avec une simple membrane plasmique, de petits ribosomes proches de ceux des procaryotes, et des organelles parsemées [9, 10, 46].

### 1.4.3 Phase de différenciation

[9, 10, 46]

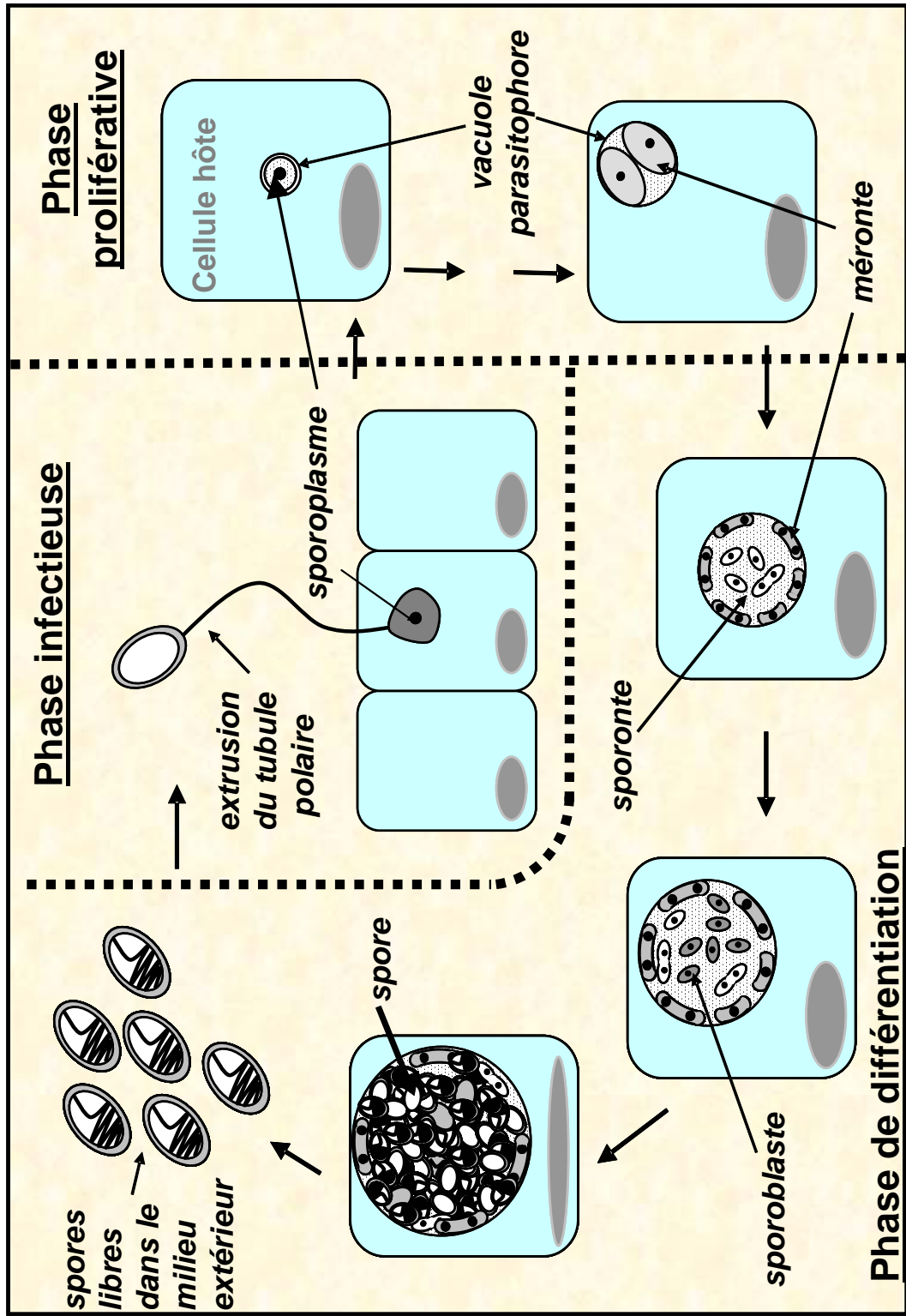
Pendant que les formes prolifératives se différencient en sporoblastes puis en spores dans les sporontes, les mérontes restent attachés et étroitement alignés sur la membrane plasmique. Cette dernière s'épaissit uniformément, les organelles des spores (vacuole postérieure, tubule polaire enroulé, disque d'ancrage) sont formées, et le cytoplasme devient de plus en plus électron-dense. Au cours du développement, les spores restent enfermées dans la vacuole parasitophore pour toutes les espèces du genre *Encephalitozoon*. Pour *Enterocytozoon bieneusi* et *Nosema* spp, les spores restent en contact direct avec le cytoplasme. L'endospore translucide aux électrons, la vacuole postérieure claire, les entrecroisements du tubule polaire enroulé caractérisent la spore mature. L'élargissement de la vacuole parasitophore et/ou de la cellule hôte par les parasites conduit à la rupture de la cellule-hôte et au relargage des spores dans l'espace extracellulaire. L'infection est disséminée par l'extension directe des spores dans les cellules environnantes, par introduction dans le système vasculaire et les cellules du système des phagocytes mononucléés [13] ou par les deux méthodes.

La rupture des cellules est également associée à une réaction inflammatoire et l'inflammation chronique provoque le développement de lésions granulomateuses [23].

Durant les premières étapes de l'infection intestinale, les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* peuvent être retrouvées dans les fèces. Cependant, *Encephalitozoon cuniculi* dissémine pour infecter des sites comme les reins ou le tractus respiratoire. Les spores sont alors retrouvées dans les urines, où elles apparaissent environ le 30<sup>ème</sup> jour après l'infection, et les sécrétions respiratoires [10, 13].

Le cycle est présenté en figure 2.

Figure 2 : Cycle d'*Encephalitozoon cuniculi* (d'après I. WAWRZYNYIAK [46 bis])





## **2 L'encéphalitozoonose du lapin**

### **2.1 Epidémiologie**

#### **2.1.1 Epidémiologie descriptive**

Maladie cosmopolite [12], l'encéphalitozoonose a été décrite chez le lapin en Europe, en Turquie [12], aux Etats-Unis, au Japon [18], au Kenya [48] ou en Australie [42]...

##### **2.1.1.1 Prévalence**

La prévalence est extrêmement variable selon le mode de vie et d'exploitation des lapins et d'une étude à l'autre.

###### **2.1.1.1.1 Chez le lapin de laboratoire**

*Encephalitozoon cuniculi* est fréquemment rencontré chez les lapins de laboratoire avec une prévalence de 25 à 95% [12, 25] et le nombre de séropositifs varie d'une colonie à une autre [12]. Cependant, la présence d'anticorps dans le sérum signifie que les lapins ont été en contact avec le parasite, ils ne sont pas pour autant atteints d'encéphalitozoonose [7, 10, 23]. De plus, le diagnostic est rarement établi chez les lapins de laboratoire puisque les lapins séropositifs sont sacrifiés [13, 22, 33].

###### **2.1.1.1.2 Chez le lapin d'élevage**

*Encephalitozoon cuniculi* est présent à l'état enzootique dans pratiquement tous les élevages cunicoles. Cependant, la proportion d'animaux atteints dans les élevages peut être très variable (6 à 97%) [7, 33]. Cette proportion dépend essentiellement du niveau d'hygiène dans l'élevage mais aussi de l'origine génétique, de l'âge des reproductrices et du mode de reproduction [7].

Le même problème se pose que pour le lapin de laboratoire, à savoir que les animaux séropositifs sont éliminés [13, 33, 41] donc le diagnostic n'est pas établi.

#### **2.1.1.1.3 Chez le lapin sauvage**

La séroprévalence est moins élevée chez les lapins dans leur milieu naturel, même si il s'agit de lapins nés en captivité puis relâchés dans la nature [12]. Des enquêtes sérologiques ont été menées chez des lapins sauvages en Angleterre et en Ecosse et elles étaient négatives [25]. En Australie, en 1980, une enquête sur 823 lapins sauvages de Victoria (sud est de l'Australie, région de Melbourne) n'avait détecté aucun lapin séropositif bien que leur sensibilité au parasite ait été démontrée expérimentalement [42]. Mais en 1997, une nouvelle étude a révélé, pour la première fois dans ce pays, la présence d'anticorps anti-*Encephalitozoon cuniculi* chez 20 des 81 lapins sauvages testés. Aucun des ces lapins n'excrétait de spores [42].

La seule autre donnée sur la prévalence chez les lapins sauvages (lapin de garenne), obtenue en France, rapporte une prévalence en *Encephalitozoon cuniculi* de 3,9% [37].

#### **2.1.1.1.4 Chez le lapin de compagnie**

D'après CHERMETTE et HAFFAR (1991) [5], le parasite *Encephalitozoon cuniculi* est tout à fait commun chez les lapins domestiques, près de 80% des animaux seraient infectés. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance d'étude permettant de confirmer avec certitude ce chiffre. En effet, selon les enquêtes réalisées en Allemagne par EWRINGMANN et GÖBEL [14], et en Angleterre, deux études dirigées par HARCOURT-BROWN [22, 23], chez le lapin domestique tout venant (tout lapin présenté à la consultation, sain ou non), entre 45 et 66% des animaux sont séropositifs. Dans une étude récente dirigée par KEEBLE et SHAW (2006) [25 bis], 52% des lapins sains apparaissent séropositifs. Ce type d'enquête n'a jamais été réalisé en France.

#### **2.1.1.2 Importance économique**

L'élimination des lapins de laboratoire et d'élevage atteints d'encéphalitozoonose ou testés séropositifs représente une perte économique importante [13, 36]. De plus, un retard de croissance et une baisse des performances à l'abattage peuvent être observés sans signes cliniques évidents [7, 33, 36]. Ainsi, la prise de poids des lapereaux en croissance peut être de 11% inférieure à celle des lapereaux non infectés [32, 33].

Chez le lapin de compagnie, le coût de l'éventuel traitement est à prendre en compte mais le lapin a surtout une valeur sentimentale.

## 2.1.2 Epidémiologie analytique

### 2.1.2.1 Sources de parasites

Les sources de parasites sont essentiellement les animaux hébergeant des spores, et tout particulièrement lors de localisation rénale [20]. En effet, lorsque l'infection intéresse les reins, les spores, après avoir provoqué l'éclatement des cellules parasitées, s'éliminent avec l'urine où elles apparaissent environ 30 jours après l'infection [13].

Dans les autres localisations, le processus de leur libération est mal connu ; elles doivent être dispersées dans l'environnement lors de la décomposition des cadavres ou, avant que ne se réalise ce processus, se conserver dans les tissus et être ingérées par un hôte prédateur [13, 20].

Il faut également rappeler que, durant les premières étapes de l'infection intestinale, les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* peuvent être retrouvées dans les fèces [10].

### 2.1.2.2 Modes d'infection

La contamination peut se réaliser par différentes voies [2, 7, 13, 20] :

- Par voie buccale ou nasale : absorption, léchage ou inhalation de substrats ou aliments souillés d'urine, tétée de mamelles souillées... Cette voie semble de loin la principale.
- Par voie transplacentaire : cette voie était initialement suspectée grâce à des preuves indirectes comme le diagnostic sérologique ou histologique d'une infection à *Encephalitozoon cuniculi* chez des nouveaux-nés élevés sans contamination possible [19, 21, 33, 40, 41, 44]. La preuve expérimentale a été apportée par BANEUX et POGNAN en 2003 [2] : des lapines gestantes sont diagnostiquées infectées par *Encephalitozoon cuniculi* par sérologie ; à l'autopsie à 28 jours de gestation, les lapines, les placentas et les fœtus (après césarienne pour éviter toute contamination de la mère aux fœtus) sont porteurs de la même souche (souche I) d'*Encephalitozoon cuniculi*.
- Par la voie vaginale, cette voie est suspectée, en raison de la présence possible du parasite dans le sperme [7, 20].
- D'autres voies naturelles semblent possibles : voie aérienne (trachée), souillure de la muqueuse oculaire... [7]
- Expérimentalement, les voies intraveineuse, intrapéritonéale, orale et intra-trachéale [20, 46] ont été utilisées avec succès, de même que la voie rectale [17, 20, 46], entraînant chez le lapin une encéphalitozoonose intestinale ou hépatique.

Les spores peuvent résister dans l'environnement 3 à 6 semaines à température ambiante et en milieu sec [10, 13, 22, 23, 35], et le contact avec l'eau a été identifié comme un facteur de risque dans plusieurs études épidémiologiques [10].

### **2.1.2.3 Facteurs prédisposants**

#### **2.1.2.3.1 Âge**

La séropositivité est apparemment sans relation avec l'âge des animaux affectés, bien que des cas d'encéphalitozoonose clinique avec 15% de morbidité aient été rapportés chez les jeunes lapins [41].

On peut également noter que les différentes formes d'expression clinique de l'encéphalitozoonose varient selon l'âge du lapin. Cf infra 2.2.3 Symptômes ophtalmologiques.

#### **2.1.2.3.2 Sexe**

Seule l'étude de HARCOURT-BROWN en 2004 [22] émet l'éventualité d'une prédisposition sexuelle. Cette étude sérologique sur 180 lapins présentés à un praticien vétérinaire du nord de l'Angleterre, avec ou sans signes d'encéphalitozoonose a mis en évidence : 119 lapins séropositifs, dont 40 (33%) étaient des femelles et 79 (67%) des mâles, et sur les 61 lapins séronégatifs, 33 (54%) étaient des femelles et 28 (46%) étaient des mâles. Cette distribution par sexe indique un lien possible entre les lapins mâles et la séropositivité, mais un échantillonnage plus important serait nécessaire pour prouver que cette différence est significative.

#### **2.1.2.3.3 Race**

L'encéphalitozoonose est retrouvée plus souvent chez le lapin nain que chez le lapin non nain [29, 35].

KUNSTYR et NAUMANN (1985) [29] ont fait la constatation suivante :

Des lapins non nains (19) et nains (11) présentant un signe clinique commun, un torticolis, ont été examinés. 18 des 19 lapins non nains présentaient une otite et une collection de pus dans une ou les deux oreilles moyennes. Le 19<sup>ème</sup> lapin non nain avait été infecté

expérimentalement par *Encephalitozoon cuniculi*. *Pasteurella multocida* a été isolé dans le pus et le nez (membrane muqueuse nasale) chez ces 18 lapins non nains, et chez 8 de ces 18 lapins, *Pasteurella multocida* a aussi été isolé dans le cerveau. Au contraire, chez les 11 lapins nains, la présence d'*Encephalitozoon cuniculi* a été confirmée histologiquement et sérologiquement (10 des 11 lapins séropositifs, le lapin séronégatif présentait des lésions rénales et cérébrales); un des 11 lapins nains séropositifs et présentant des lésions rénales et cérébrales, souffrait également d'une otite bilatérale où *Pasteurella multocida* a été isolée.

Il est cependant possible que ces différences soient dues à une exposition différente aux agents plutôt qu'à des degrés de sensibilité différents entre ces deux types de lapins.

Il est de plus difficile de différencier race et mode de vie/d'exploitation du lapin, et comme nous l'avons vu précédemment, la prévalence diffère d'un mode à l'autre.

#### ***2.1.2.3.4 Immunocompétence***

Les lapins nains, comme les lapins nains Angora et occasionnellement les lapins blancs de Nouvelle Zélande, semblent être plus sensibles. Ces lapins semblent aussi être prédisposés aux formes fulminantes de la maladie à cause d'une réponse immunitaire affaiblie. De même, un sevrage précoce, avec une possible fenêtre de sensibilité entre le moment où les anticorps maternels diminuent et celui où le système immunitaire propre du lapin devient efficace, peut être un facteur. La malnutrition et l'administration de stéroïdes sont susceptibles de contribuer à la progression et à la sévérité de la maladie [35].

#### ***2.1.2.3.5 Maladie sous-jacente***

Plusieurs auteurs rapportent que 70% des lapins souffrant d'encéphalitozoonose sont affectés d'une autre maladie, soit de pneumonie, soit de coccidiose ou d'abcès sous-cutanés [44]. La prévalence chez les lapins souffrant d'une autre affection est également supérieure [42].

### **2.1.3 Epidémiologie synthétique**

La séroprévalence est moins élevée chez les lapins dans leur milieu naturel, même si il s'agit de lapins nés en captivité relâchés dans la nature. Il n'y a pas de facteur de prédisposition et

leur sensibilité au parasite a été démontrée expérimentalement [42], mais il semblerait que les lapins en liberté aient moins de risque de se recontaminer avec les spores qu'ils excrètent.

Dans l'étude de THOMAS et al. (1997) [42], la prévalence de *Encephalitozoon cuniculi* chez les lapins sauvages est inférieure à 25% alors qu'elle est de 76% pour les lapins de laboratoire. Ce résultat confirme l'hypothèse de recontamination puisque les lapins de laboratoire vivent dans des lieux confinés et surpeuplés, menant à la contamination par des spores (en particulier provenant des urines) de l'environnement, des cages, de la nourriture, de l'eau, ce qui favorise la transmission orale. Le recyclage du parasite serait ainsi responsable de sa persistance [12].

Pour les lapins de compagnie, l'infectiosité des lapins séropositifs pour leurs compagnons est difficile à évaluer, même si il est fort probable que les lapins vivant dans une même cage se contaminent par ingestion ou inhalation de spores contenues dans la litière souillée par des urines contaminées. Dans un groupe de 7 lapins apparemment sains, 6 étaient séropositifs et 1 seul séronégatif. Trois autres lapins asymptomatiques ont été trouvés séronégatifs alors qu'ils vivaient avec des compagnons positifs. Il est possible que ces lapins aient été testés avant qu'ils ne développent une réponse anticorps bien que l'un d'entre eux ait été testé à nouveau un an plus tard et était toujours séronégatif. Il est également probable que ses compagnons séropositifs ne portaient plus le parasite [23].

La contagion est également très dépendante des mesures d'hygiène générale. Cf infra 2.8.2.1 Prophylaxie sanitaire.

## **2.2 Symptômes**

Chez les lapins, l'infection par *Encephalitozoon cuniculi* cause habituellement une légère maladie sub-clinique asymptomatique, qui affecte probablement les animaux à réponse immunitaire affaiblie, mais l'infection peut aussi se manifester par une maladie parfois fatale. Des signes d'affections chroniques (retard de croissance, cachexie, mauvais état général...) peuvent être observés durant cette phase latente. Quand *Encephalitozoon cuniculi* induit la maladie, les premiers signes cliniques qui apparaissent sont des signes nerveux, rénaux et/ou ophtalmologiques. Ces signes peuvent être observés séparément ou en combinaison [3, 5, 12, 13, 22, 23, 32, 33, 35, 36, 41, 42, 44, 46].

### 2.2.1 Symptômes nerveux

Les signes neurologiques qui sont habituellement attribués à l'encéphalitozoonose sont des désordres nerveux centraux tels que le torticolis ou syndrome vestibulaire (Figure 3), les crises convulsives et les tremblements, le nystagmus, des symptômes locomoteurs : faiblesse du train postérieur, incoordinations, perte d'équilibre, ataxie, parésie-paralysie, opisthotonos, hyperesthésie..., et le coma [13, 14, 21, 22, 23, 33, 35, 41, 46]. Des signes neurologiques moins sévères peuvent apparaître, mais sont seulement relevés d'après les observations des propriétaires [23].

Ces symptômes correspondent à une encéphalite.

**Figure 3 : Torticolis chez un lapin de compagnie (Cliché JF QUINTON)**



### 2.2.2 Symptômes rénaux

Le site de prédilection pour le développement du parasite est le rein d'où l'apparition possible d'une insuffisance rénale avec une polyuro-polydypsie [22], une augmentation de la créatinine et de l'urée dans le sang [6, 14]. Peuvent aussi s'ajouter une anémie, une hyperkaliémie et une hyponatrémie [14]. L'analyse des valeurs de l'hématologie et de l'analyse biochimique révèle une concentration élevée dans le sang de l'urée, du  $\text{NH}_3$  et de la créatinine chez des lapins séropositifs asymptomatiques, contrairement aux lapins séronégatifs [14], ce qui est intéressant du point de vue diagnostique.

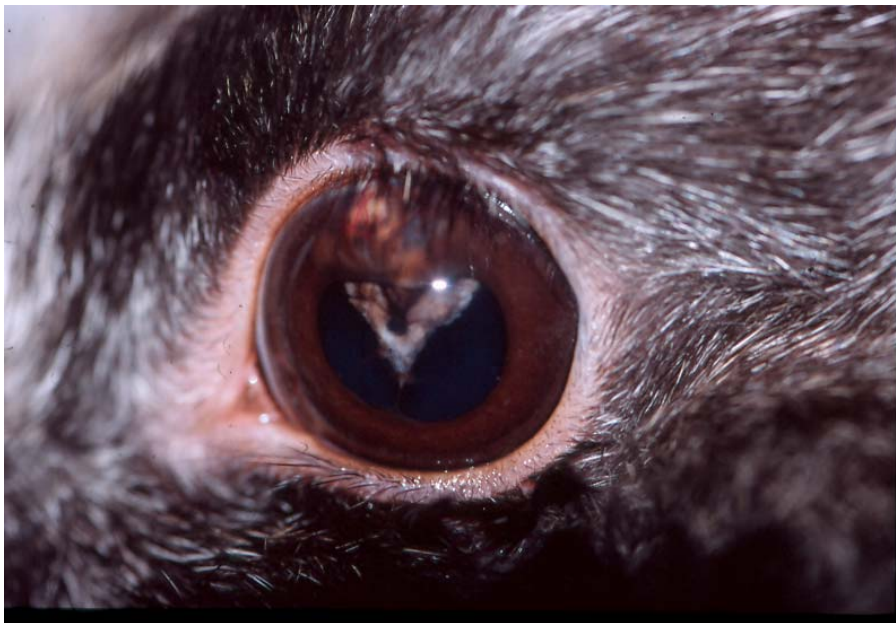
Certains lapins peuvent souffrir d'incontinence urinaire. Il est possible que cette incontinence soit une autre manifestation neurologique de l'encéphalitozoonose ou une conséquence de la polyuro-polydypsie [22].

### 2.2.3 Symptômes ophtalmologiques

Les symptômes ophtalmologiques associés à *Encephalitozoon cuniculi* sont la rupture spontanée de la capsule du cristallin et l'uvéite phacoclastique (Figure 4). Ces symptômes semblent être sporadiques, habituellement chez les jeunes lapins (moins de 2 ans). Les lapins affectés ont une rupture de la capsule et une uvéite et aucun antécédent de traumatisme oculaire. On observe une masse blanchâtre originaire de la capsule du cristallin, avec une inflammation centrée autour du point de rupture de la capsule (hypopion). L'inflammation associée est progressive et ne répond pas au traitement. Cet état est souvent unilatéral [22, 23, 27, 40, 49].

*Encephalitozoon cuniculi* est aussi impliqué comme cause de cataracte bilatérale chez le lapin de laboratoire [27].

**Figure 4 : Uvéite phacoclastique chez un lapin de compagnie (Cliché D BOUSSARIE)**



Ces symptômes sont probablement dus à une infection *in utero*. Cf infra 2.4.2 Pathogénie de l'encéphalitozoonose oculaire.



## **2.2.4 Autres symptômes**

En début d'infection, *Encephalitozoon cuniculi* peut également se développer dans les poumons et induire des difficultés respiratoires [7, 46].

Chez certains lapins, une ostéodystrophie et des fractures spontanées peuvent apparaître [14] et la présence d'ascite est possible, mais rare [32].

## **2.3 Lésions**

### **2.3.1 Lésions macroscopiques**

L'apparence typique d'un rein de lapin infecté par *Encephalitozoon cuniculi* est grêle et ficelée avec des foyers déprimés, pâles à plus foncés, irréguliers et circulaires, sur le cortex rénal. En effet, les premières lésions montrent une inflammation granulomateuse focale. Quand elles évoluent, les lésions montrent une fibrose interstitielle et un effondrement du parenchyme, ce qui donne au rein une apparence vieillie et ficelée caractéristique. Ces changements sont bilatéraux, blanc-grisâtres et ont tendance à être plus apparents après la fixation au formol. Au retrait de la capsule, il n'y a pas d'arrachement du parenchyme rénal [12, 22, 23, 33]. Ces lésions sont évidentes à l'autopsie et fournissent une méthode simple et peu onéreuse de détecter une infection ancienne à *Encephalitozoon cuniculi* [22].

Hormis l'aspect des reins, il n'y a pas de signes macroscopiques évidents à l'autopsie sauf, peut être, une légère réaction splénique aspécifique [33].

### **2.3.2 Lésions histologiques**

#### **2.3.2.1 Lésions du système nerveux**

L'examen histologique permet de noter les lésions caractéristiques d'une méningo-encéphalite chronique lymphocytaire non suppurative accompagnée de granulomes focaux ou multifocaux. On peut également observer une inflammation du tissu astrocytaire et une infiltration lymphocytaire périvasculaire [12, 19, 33, 46].

L'encéphalite granulomateuse, qui représente la lésion spécifique de la maladie, peut apparaître de manière aléatoire dans toutes les parties du cerveau, le plus souvent avec une distribution périvasculaire [12, 33]. On aurait quelquefois relevé une certaine prédilection pour l'hippocampe et le cortex cérébral [33].

Le granulome typique présente un centre nécrotique très circonscrit, entouré de grands macrophages, d'aspect épithélioïde, de quelques lymphocytes, d'une réaction des cellules gliales et plus rarement de cellules géantes. On peut retrouver aussi des granulomes épithélioïdes sans centre nécrotique. La lésion inflammatoire primaire est une périvascularite avec des manchons cellulaires périvasculaires, composés de macrophages d'origine microgliale et de lymphocytes. Dans les macrophages, on peut observer quelques parasites. Les granulomes s'observent toujours en concomitance avec des manchons cellulaires périvasculaires (périvascularite) alors que la présence de ces derniers peut être le seul indice d'encéphalite, en particulier dans les formes modérées [12, 33]. Ces lésions ont tendance à être plus diffuses et plus sévères chez les lapins dont le cerveau contient des pseudokystes [12].

Les lésions méningées sont ordinairement discrètes, distinguées par des infiltrations de lymphocytes, de cellules plasmatiques et de macrophages ; elles sont observées chez les lapins avec des pseudokystes en l'absence d'une quelconque réaction tissulaire [12, 33, 35]. L'infiltration leptoméningée est parfois considérable à la proximité des granulomes corticaux. La présence de granulomes dans le cervelet n'est pas fréquente [33].

Chez quelques lapins, une inflammation de l'épendyme a été observée [12] et quelques cas d'hydrocéphalie interne ont été signalés [33].

La présence d'*Encephalitozoon cuniculi* dans le système nerveux périphérique est rare et peut expliquer des cas avec des signes neurologiques inhabituels [35].

Ces lésions n'apparaissent généralement pas lors du premier mois d'infection [19].

### **2.3.2.2 Lésions rénales**

Histologiquement, les premières lésions rénales montrent une néphrite interstitielle non purulente granulomateuse lymphoplasmocytaire focale à segmentée. Ces lésions sont visibles dans le cortex et dans la médulla, même si elles sont plus fréquentes au niveau de la papille rénale. Des spores ovoïdes peuvent être mises en évidence à l'intérieur des cellules ou libres dans les tubes collecteurs. Dans les étapes suivantes, une fibrose interstitielle peut apparaître et le parasite n'est plus visible [12, 23, 46]. Cette fibrose est généralement accompagnée de peu de collagène et une dilatation variable des tubes collecteurs et de la anse de Henlé est visible dans le cortex. Des infiltrations interstitielles lymphoïdes locales ou diffuses, faisant le tour d'un épithélium tubulaire discrètement nécrotique, peuvent également être observées [12]. De petites cicatrices sur la corticale des reins apparaissent à l'histologie, en forme de V,

dépansions sous-capsulaires qui peuvent parfois s'étendre jusqu'à la médulla [32]. Ces lésions rénales n'altèrent pas toujours le bon fonctionnement des reins [23].

### **2.3.2.3 Lésions oculaires**

Les yeux des lapins atteints d'uvéite phacoclastique sans trauma et réfractaire au traitement sont histologiquement remarquablement similaires. La lésion majeure est la rupture de la capsule antérieure du cristallin et la présence de neutrophiles dans le cortex du cristallin. Dans tous les cas examinés, il y a une zone définie autour de l'inflammation. Les neutrophiles sont toujours présents très profondément dans le cortex cristallinien. Autour des neutrophiles se trouve une couche de macrophages écumeux surmontée d'un anneau de tissu fibreux contenant des lymphocytes et des cellules sanguines. Il est intéressant de noter que l'inflammation est entièrement centrée sur le point de rupture de la capsule du cristallin, et que l'uvéite antérieure est relativement intacte. Le segment postérieur n'est pas affecté ; en particulier, il n'y a pas de signes histologiques de glaucome malgré l'impression d'une pupille bloquée par l'inflammation et la prolifération péricristallinienne. Les yeux examinés contiennent pour la plupart des parasites dans le cristallin. *Encephalitozoon cuniculi* est uniquement trouvé à l'intérieur du cortex liquéfié du cristallin et habituellement à proximité de l'épithélium cristallinien. Dans les cristallins où l'épithélium cristallinien a migré postérieurement, les parasites peuvent également se trouver à proximité de la capsule postérieure du cristallin. Aucun organisme n'est détecté à l'extérieur du cristallin [49].

### **2.3.2.4 Autres lésions histologiques**

Des lésions inflammatoires dans d'autres organes s'observent également à l'examen histologique. Elles se situent dans la plupart des cas, dans le foie, les poumons, le myocarde, la rate et les muscles squelettiques, sous forme de foyers d'infiltration lymphocytaire et macrophagique, périvasculaires, multifocaux et interstitiels [6, 33, 35]. Ces lésions sont évaluées comme faisant partie de la réponse immune générale de l'organisme [6].

Dans le foie, on peut reconnaître les parasites dans les hépatocytes [33]. Une inflammation granulomateuse légère à modérée du tractus biliaire [2] ou une hépatite focale non suppurative [44] peuvent également être observées. Expérimentalement, les lésions hépatiques sont plus sévères quand l'infection est initiée dans le tractus gastro-intestinal [17] et il existe différents degrés de sévérité en fonction de la dose d'induction et du temps d'incubation accordé.

Dans l'expérience de FUENTEALBA *et al* (1992) [17], les lapins qui ont reçu une faible dose ( $5 \times 10^3$  spores) d'*Encephalitozoon cuniculi* et euthanasiés 60 jours post infection présentent une infiltration bénigne à modérée de cellules mononucléaires périportales composée de lymphocytes, de cellules plasmatiques et de quelques macrophages et éosinophiles. Les cellules inflammatoires sont plus nombreuses autour de la veine porte hépatique. Il n'a pu être mis en évidence aucune lésion hépatocytaire à ce moment. Les cellules de Kupffer étaient hypertrophiques et hyperplasiées.

Les lapins qui ont reçu des doses moyennes ( $5 \times 10^5$  spores) et fortes ( $5 \times 10^7$  spores) et qui ont été euthanasiés 60 jours après présentaient des infiltrations granulomateuses périportales modérées, caractérisées par la présence de nombreux macrophages, cellules épithéliales, de quelques cellules multinucléées géantes, de lymphocytes et de cellules sanguines. Les cellules inflammatoires semblaient aussi infiltrer l'adventice et la média de la veine porte hépatique et des branches de l'artère hépatique. L'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules de Kupffer ont aussi pu être observées. Quelques cellules hépatocytaires nécrosées se trouvaient dispersées dans les zones des veines moyennes et centrales du foie. De nombreux éosinophiles étaient présents dans la zone d'inflammation, en particulier autour de la veine porte hépatique et dans les sinusoides.

Les foies des lapins euthanasiés 120 jours après l'infection par des doses bases d'*Encephalitozoon cuniculi* répondaient par une inflammation assez variable d'un animal à l'autre, de bénigne à modérée. A 120 jours post-infection, les foies des lapins ayant reçu des doses moyennes et fortes souffraient d'une inflammation granulomateuse périportale modérée à sévère. Les granulomes étaient composés de nombreux macrophages, de quelques cellules épithéliales, et occasionnellement de cellules géantes. Le centre de ces granulomes contenait souvent des hépatocytes nécrosés. Les zones des veines moyennes et centrales du foie possédaient quelques foyers composés de 3 à 5 hépatocytes avec une augmentation du nombre d'éosinophiles et de noyaux pycnotiques.

La différence est significative entre les moyennes et fortes doses par rapport au contrôle négatif.

Dans les poumons, *Encephalitozoon cuniculi* peut infiltrer les parois alvéolaires et induire une pneumonie interstitielle histiocytaire [9, 44].

Dans le myocarde, on peut observer une myocardite [35, 44] et les fibres musculaires cardiaques peuvent être séparées par une infiltration diffuse ou focale de cellules mononucléaires [12].

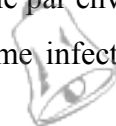
## **2.4 Pathogénie**

### **2.4.1 Pathogénie générale**

Certains pensent que la vascularite est la lésion fondamentale dans cette maladie, résultant probablement de blessures mécaniques des vaisseaux par le parasite [33, 35]. Les granulomes auraient pour origine ces lésions périvasculaires et se formeraient à la suite de la rupture de pseudo-kystes, ce qui correspondrait à la réaction inflammatoire cellulaire. Ce concept est renforcé par la découverte d'*Encephalitozoon cuniculi* dans l'endothélium vasculaire avec des changements fibrinoïdes et inflammatoires [35]. De plus, les granulomes s'observent toujours en concomitance avec des manchons cellulaires périvasculaires (périvascularite) alors que la présence de ces derniers peut être le seul indice d'encéphalite, en particulier dans les formes modérées [33]. Selon d'autres auteurs, les granulomes se développeraient à partir des nodules microgliaux qui, en même temps que des proliférations gliales à éléments épars, accompagnent les susdites lésions principalement dans le cortex [33].

### **2.4.2 Pathogénie de l'encéphalitozoonose oculaire [49]**

La pathogénie de l'uvéite phacoclastique chez les animaux, proche de l'endophtalmite phacoanaphylactique chez l'homme, est peu connue. Il n'est pas certain que ces maladies soient identiques malgré le fait que les deux maladies soient déclenchées par la rupture d'un cristallin auparavant normal. Le déroulement d'une uvéite phacoclastique semble comporter 2 phases : l'inflammation et la prolifération ; la première domine chez l'homme et le lapin, la seconde chez le chien et le chat. La phase inflammatoire est considérée comme le résultat d'un relargage soudain de suffisamment de protéines cristalliniennes, dans l'humeur aqueuse, dans la circulation jusqu'à la rate, pour stimuler les cellules T. Une réponse immunitaire est alors initiée contre les protéines cristalliniennes normales remaniant le cristallin. La phase proliférative est dominée par la migration (métaplasie fibreuse) et la prolifération de l'épithélium de cristallin à cause d'un blocage de la pupille et/ou de synéchies postérieures. L'identification d'*Encephalitozoon cuniculi* dans la plupart des cristallins affectés conduit à l'hypothèse que cet organisme peut être responsable de la rupture de la capsule antérieure du cristallin et/ou à l'origine d'une inflammation granulomateuse. La pathogénie exacte n'est pas connue mais deux mécanismes différents sont envisageables. La probabilité que les organismes microsporidiens soient capables de pénétrer dans la lentille par envahissement des cellules hôtes au moyen du tubule polaire (par lequel le sporoplasme infectant est injecté)



semble difficile car la capsule antérieure est épaisse de 50-70  $\mu\text{m}$ . L'autre mécanisme, le plus probable, est l'infection *in utero* au moment où la capsule de cristallin est très fine voire absente. Comme ces organismes se concentrent dans ou à proximité de l'épithélium du cristallin, il est possible que l'interruption des fonctions normales de l'épithélium soit responsable de la faiblesse et éventuellement de la rupture de la capsule [22, 23, 27, 40, 49].

## **2.5 Immunité**

La réponse immunitaire face à une infection par *Encephalitozoon cuniculi* a surtout été étudiée chez la souris et chez l'homme [10, 26, 38].

### **2.5.1 Interaction hôte-parasite**

Les effets pathologiques des microsporidies se divisent en 2 grands groupes [38] :

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

2- La deuxième forme est la forme chronique, avec éventuellement quelques symptômes de façon transitoire, puis un silence clinique avec, toutefois, une persistance de l'infection. C'est la forme touchant généralement les adultes, la résistance de l'hôte semblant liée principalement à des mécanismes de défense immunitaire.

Ainsi, les souris immunocompétentes infectées par *Encephalitozoon cuniculi* sont peu susceptibles de développer la maladie. Si ces souris sont mises sous traitement immunosuppresseur à base de corticoïdes, des symptômes se développent, ce qui prouve la persistance latente du parasite chez ces animaux [26]. L'infection latente asymptomatique pendant laquelle le parasite se multiplie et la réponse immunitaire de l'hôte sont donc dans la balance. A partir de cela, il est évident que cet équilibre peut être modifié en faveur ou en défaveur de la multiplication des microsporidies [36].

Il semblerait également que certaines souches de souris aient une plus grande résistance, au vu de la variabilité du pourcentage de macrophages contenant des parasites à la suite d'une infection intra-péritonéale. Cela signifierait qu'il existe une composante génétique à la capacité de résistance de l'organisme [26].

## **2.5.2 Rôle de l'immunité à médiation cellulaire**

### **2.5.2.1 Importance de l'immunité à médiation cellulaire**

La réponse immunitaire à médiation cellulaire semble être la plus importante dans la lutte contre la maladie causée par les microsporidies. En effet, les souris dont ce type d'immunité est expérimentalement supprimé (souris athymiques, ou « knockout » pour les lymphocytes T CD8+) meurent des suites de l'infection, et les personnes déficientes en lymphocytes T (atteint du SIDA, suivant un traitement anti-rejet...) courent un risque plus important de déclarer une microsporidiose [10]. Des souris athymiques meurent lorsqu'elles sont infectées, mais le transfert de lymphocytes T sensibilisés spécifiquement, ou de cellules de rate enrichies en lymphocytes T sensibilisés, a une action protectrice. Par ailleurs, les macrophages vont tuer les parasites s'ils sont, au préalable, sensibilisés grâce au surnageant d'une culture de lymphocytes T spécifiquement sensibilisés. Enfin, les lymphocytes T ont une action protectrice en relâchant des interférons  $\gamma$  ainsi que peut-être d'autres cytokines [38].

### **2.5.2.2 Rôle des cytokines**

Les cytokines utilisées dans la réponse cellulaire Th1, comme l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et l'interleukine 12 (IL-12), semblent avoir un rôle important dans la lutte de l'organisme contre les microsporidies [26]. *In vitro*, des macrophages ont pu être activés et détruire ces parasites après incubation avec des IFN- $\gamma$ . De plus, le taux d'IFN- $\gamma$  augmente significativement au cours d'une infection par *Encephalitozoon cuniculi* par rapport aux sérums témoins [10]. Enfin, les souris infectées par *Encephalitozoon cuniculi* traitées avec des anticorps dirigés contre IFN- $\gamma$  et IL-12 courent un risque plus important de développer une microsporidiose et la mortalité augmente [26].

En revanche, la production de cytokines de la réponse cellulaire de type Th2 est minimale. On n'a pas trouvé d'IL-4 dans le sérum de souris infectées, mais une augmentation de l'IL-10 est observée dans les cellules spléniques. Or, IL-10 aurait un rôle dans la régulation de la réponse Th1, ce qui expliquerait sa production [26].

### **2.5.2.3 Types de lymphocytes T induits**

Les deux types de lymphocytes T, CD4+ et CD8+, semblent importants dans la défense de l'organisme, mais les souris privées de CD8+ semblent encore plus fragilisées que celles

privées de CD4+ [10]. De plus, au cours de l'infection par *Encephalitozoon cuniculi*, le nombre de lymphocytes T CD8+ augmente dès le 10<sup>ème</sup> jour post-infection, alors que le nombre de lymphocytes T CD4+ ne montre pas d'augmentation significative au cours de l'expérimentation [26]. Enfin, l'analyse des marqueurs d'activation des lymphocytes T CD8+ suggère l'activation de cette réponse dès le 3<sup>ème</sup> jour post-infection [26].

Cependant, chez l'homme, c'est la baisse de CD4+, dans le cas du SIDA, qui favorise le développement d'une microsporidiose [10].

## **2.5.3 Réponse des lymphocytes T cytotoxiques à l'infection**

### **2.5.3.1 Rôle des lymphocytes T CD8+**

L'effet protecteur des lymphocytes T CD8+ intervient par leur capacité à produire des cytokines. Les lymphocytes T CD8+ peuvent également diminuer la charge parasitaire en éliminant les cellules infectées dans les tissus. Ceci s'effectue majoritairement par la création de pores transmembranaires (canaux à ions) via les perforines [26].

### **2.5.3.2 Régulation des lymphocytes T CD8+**

#### **2.5.3.2.1 Rôle des lymphocytes T CD4+**

Dans la majorité des cas, les cellules CD8+ sont activées par les lymphocytes CD4+ produisant de l'IL-2. Cependant, dans le cas des microsporidioses, des souris ne disposant que de cellules CD8+ se défendent très bien contre l'infection. L'infection par *Encephalitozoon cuniculi* offre donc un exemple d'induction des lymphocytes CD8+ en l'absence de lymphocytes CD4+ [26].

#### **2.5.3.2.2 Rôle des lymphocytes T $\gamma\delta$**

Ces cellules sembleraient être impliquées dans la mise en route primaire de la réponse immunitaire, car l'augmentation du nombre de ces cellules produisant des IFN- $\gamma$  est directement suivie d'une augmentation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ protecteurs d'IFN- $\gamma$ . Le nombre de ces lymphocytes augmente quelques jours après l'infection par *Encephalitozoon cuniculi*, mais les souris n'en disposant pas peuvent quand même survivre à



l'infection. Selon les observations, il semblerait que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  activeraient les lymphocytes T CD8+ grâce à leur production précoce de l'IFN-  $\gamma$  nécessaire [26].

#### **2.5.4 Rôle de l'immunité à médiation humorale**

Des IgM, puis de IgG contre les microsporidies sont générées chez les individus immunocompétents et persistent tout au long de la vie de l'hôte. Chez les individus immunodéprimés, la réponse en anticorps au cours de l'infection est variable. Cependant, le transfert de lymphocytes B activés ou de sérum hyper-immun à des souris athymiques ne suffit pas à les protéger de la mort suite à une infection par *Encephalitozoon cuniculi*. Quoiqu'il en soit, lors de l'infection par *Encephalitozoon cuniculi*, il peut se produire un grand nombre d'anticorps contre de nombreux antigènes de cet organisme et nombreux de ces anticorps font des réactions croisées avec d'autres microsporidies. Bien que le transfert de sérum hyper-immun ne protège pas les souris athymiques d'une microsporidiose léthale par *Encephalitozoon cuniculi*, les anticorps semblent cependant avoir un rôle protecteur restreint en opsonisant les microsporidies, ce qui facilite leur prise en charge par les macrophages, et en les neutralisant avant qu'elles n'infectent une nouvelle cellule-hôte. De plus, la fixation du complément, induite par les anticorps spécifiques, pourrait causer la lyse des formes immatures du parasite, qui n'ont pas encore d'enveloppe chitineuse épaisse [10]. Enfin, il semble que les IgG traversent le placenta et confèrent une immunité passive aux lapereaux pendant au moins 2 semaines, voire 6 à 7 semaines [13].

## **2.6 Diagnostic**

### **2.6.1 Diagnostic différentiel**

#### **2.6.1.1 Diagnostic différentiel des troubles neurologiques**

Les troubles nerveux et le torticolis ont un grand nombre d'autres causes possibles [16, 22]:

- Une gale auriculaire à *Psoroptes cuniculi* s'étant propagée à l'oreille interne. Le diagnostic est facile par observation du cérumen, abondant et jaunâtre. Au microscope, de nombreux acariens ou leurs œufs sont mis en évidence [16, 44].
- Une otite suppurée moyenne causée par *Pasteurella multocida* ne montre pas souvent de preuve clinique de l'infection. L'otite peut s'étendre dans l'oreille interne ce qui entraîne un torticolis. Occasionnellement, on peut avoir un nystagmus. Lorsque l'oreille moyenne

est affectée, les bulles tympaniques sont pleines de pus épais et jaune. On peut alors observer une rupture de la membrane tympanique [16]. C'est pourquoi la radiographie des bulles tympaniques et l'examen du conduit auditif externe peuvent être utiles. Le diagnostic se fait par sérologie de type ELISA. Une rémission est possible si on applique un traitement antibiotique à l'aide de chloramphénicol, d'enrofloxacin ou de sulfamide-triméthoprime. La réponse au traitement se fait dans la semaine [16]. Cette affection ascendante de la cavité nasale, via la trompe d'Eustache, est plus courante dans les colonies de lapins gardées dans des conditions intensives, que chez les lapins de compagnie qui sont seuls ou en petits groupes. Chez les lapins de compagnie, l'encéphalitozoonose est plus souvent la cause d'un syndrome vestibulaire que la pasteurellose [22].

- Un traumatisme crânial, une fracture spinale, une subluxation, une spondylose, de l'arthrose ou une dégénérescence discale [22]. Ces étiologies peuvent être éliminées par examen physique poussé et grâce à une radiographie.
- Une tumeur du système nerveux central [22].
- Un dysfonctionnement vestibulaire avec torticolis ipsilatéral : soit central (lésion de la médulla ou du cervelet), soit périphérique dans l'oreille interne [16].
- Une maladie cardiaque, hépatique ou rénale peut être à l'origine d'une ataxie [22].
- Les suites de coryza même après rémission des symptômes de cette maladie [16].
- Une larva migrans cérébrale à *Baylisascaris procyonis* (en Amérique du nord). Cette maladie est caractérisée par des nodules blancs surélevés sur l'épicarde, l'endocarde et le foie (granulomes larvaires) [16, 22].
- Une toxoplasmose [22, 41, 44]. Cette maladie est souvent asymptomatique mais elle peut se traduire par une encéphalite granulomateuse accompagnée de foyers de nécrose hépatique et splénique. Cependant, elle affecte très rarement les reins [44].
- Une encéphalite bactérienne à *Listeria* [16, 44], *Pasteurella* ou staphylocoque [44].
- Un déficit en vitamine E et Sélénium [41].

### **2.6.1.2 Diagnostic différentiel des troubles oculaires**

Le diagnostic différentiel des troubles oculaires est beaucoup plus simple car la seule autre origine connue de l'uvéite phacoclastique est le traumatisme.

## **2.6.2 Méthodes de diagnostic**

### **2.6.2.1 Sérologie**

Les réactions sérologiques sont basées sur la présence d'anticorps dans le sérum des sujets parasités : des observations réalisées chez le lapin infecté expérimentalement ont révélé que des IgM et des IgG apparaissent environ le 13<sup>ème</sup> jour (soit environ 15 jours avant que les spores ne soient décelables dans l'urine) et persistent 2-3 mois, avec un taux maximal vers la 6<sup>ème</sup> semaine, sauf en cas de réinfection, qui stimule la réaction immunitaire [13]. La plus longue étude a ainsi montré que ce titre culminant en anticorps peut être maintenu 400 jours post-infection [22]. Les tests sérologiques principalement décrits dans la littérature sont l'ELISA, l'immunofluorescence indirecte, l'immunoélectrophorèse, la réaction à l'encre de Chine et le test d'agglutination indirecte.

#### **2.6.2.1.1 ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)**

Le principe est de fixer les anticorps recherchés entre, d'une part, les antigènes spécifiques fixés sur une lamelle, et, d'autre part, des anticorps liés aux immunoglobulines recherchées et marqués d'une enzyme. Après lavage, on ajoute un substrat de l'enzyme qui provoque l'apparition d'une coloration si le test est positif. Ainsi, la concentration en anticorps sériques est proportionnelle à la densité optique. Différentes techniques ELISA sont utilisées en recherche. Elles varient d'une équipe à l'autre selon les réactifs utilisés ou les temps d'incubation, entre autres.

Pour cela, on utilise comme antigènes des spores d'*Encephalitozoon cuniculi* prélevées sur un lapin infecté spontanément. Les spores sont diluées puis étalées sur des lames à haute fixation qui sont conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Le sérum de l'animal à tester est dilué, mis en contact avec l'antigène, puis traité avec des anti-immunoglobulines de lapin issues de sérum de chèvre et liées à une peroxydase. Le substrat utilisé ensuite pour révéler la fixation de l'enzyme est la tétraméthylbenzidine. Les absorbances sont lues à 450 nm. Le test ELISA est considéré positif en fonction de la densité optique du sérum dilué [3].

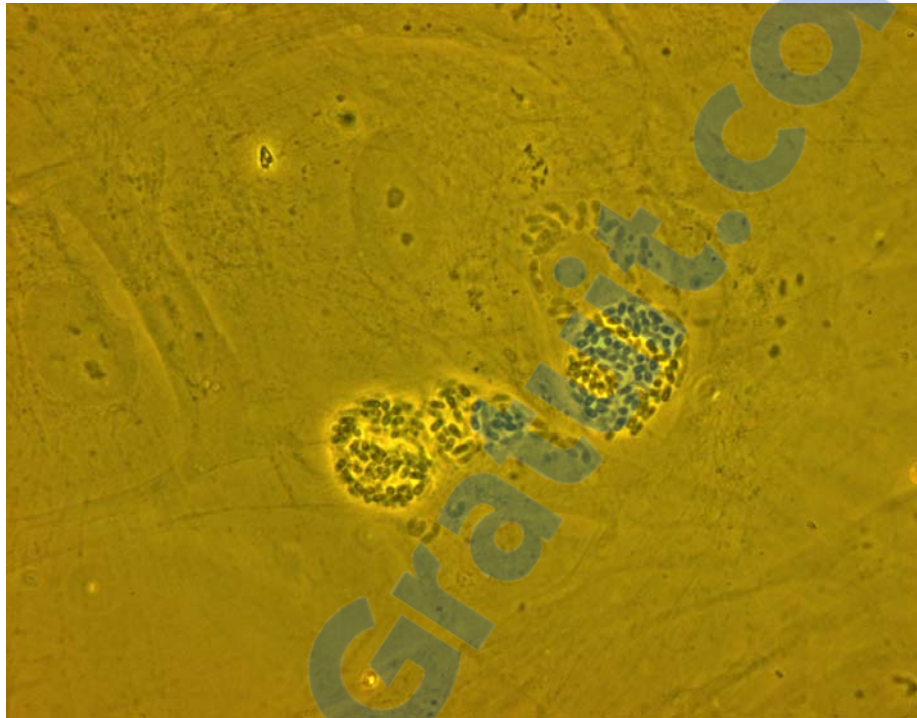
#### **2.6.2.1.2 Immunofluorescence indirecte**

Le principe est de fixer les anticorps recherchés entre, d'une part, les antigènes spécifiques fixés sur une lamelle (Figure 5), et, d'autre part, des anticorps liés à un fluorochrome qui,

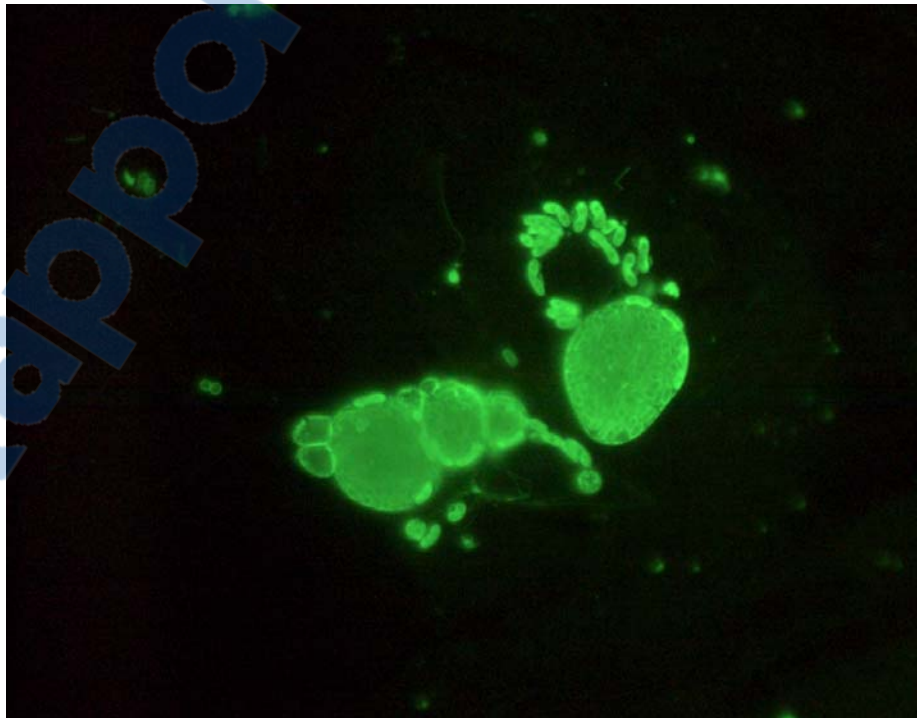
excité par des UV, réémet dans le visible (vert, orange, rouge). Si le test est positif (présence d'anticorps spécifiques), la fluorescence est observable.

Pour cela, on prépare des lames portant l'antigène à partir d'une suspension ou d'une culture cellulaire de spores d'*Encephalitozoon cuniculi* étalées sur des lames. On incube ces lames avec le sérum de l'animal à tester, puis elles sont lavées, colorées avec des anti-immunoglobulines de lapin issues de sérum de chèvre et liées à un fluorochrome. Les lames sont enfin lavées, séchées à l'air et examinées au microscope à fluorescence au grossissement 200. Le sérum est d'abord testé à une dilution de  $1/10^{\text{ème}}$ , puis si il est positif (Figure 6), il est réexaminé en doublant les dilutions jusqu'au  $1/2560^{\text{ème}}$ , ce qui permet de quantifier les anticorps [3].

**Figure 5 : Vacuole parasitophore dans une culture cellulaire en lumière blanche**  
(Cliché I. WAWRZY尼亚K)



**Figure 6 : Même vacuole mise en contact avec un sérum positif**  
(Cliché I. WAWRZY尼亚K)



### **2.6.2.1.3 Immunoélectrophorèse**

Le principe est de faire migrer par électrophorèse sur gel le sérum de l'animal à tester mélangé à l'antigène (spores d'*Encephalitozoon cuniculi*). La migration se faisant en fonction du poids moléculaire, le complexe antigène-anticorps peut être repéré par un trait de précipitation différent de ceux correspondant au sérum seul ou à l'antigène seul [3].

### **2.6.2.1.4 Réaction à l'encre de Chine ou Carbon ImmunoAssay (CIA)**

Le principe dépend de l'attachement des particules de carbone sur la partie Fc des IgG de lapin. Cette technique a prouvé sa spécificité et sa fiabilité [12].

Pour cela, le sérum de l'animal à tester est dilué puis mélangé avec une quantité égale de suspension d'antigènes (spores d'*Encephalitozoon cuniculi*) et mis en incubation. La suspension sérum-antigènes est mélangée avec l'encre de Chine sur une lame de microscope. Après l'application d'une lamelle, la lame est observée au microscope optique sous huile à immersion, grossissement 400. En cas de résultat positif, les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* (antigènes) sont colorées en noir ou gris par la fixation des anticorps sur la paroi des parasites. Les sérums positifs sont réexaminés après avoir doublé la dilution jusqu'au 1/2560<sup>ème</sup> afin de quantifier les anticorps [3, 12, 13, 20].

### **2.6.2.1.5 Test d'agglutination indirecte**

Le principe est de fixer les anticorps recherchés entre, d'une part, les antigènes spécifiques libres, et, d'autre part, des anticorps fixés sur des billes de petit diamètre (<10µm).

Une suspension d'*Encephalitozoon cuniculi* obtenus en cultures cellulaires est mise à incuber dans le sérum de l'animal à tester, utilisé à diverses dilutions : en cas de positivité, les parasites, qui ont fixé les anticorps de l'animal, vont se fixer sur les billes imprégnées d'antiglobulines de lapin (préparés sur chèvre) ; cette fixation est vérifiée au microscope : une bille est considérée comme positive, si une ou plusieurs spores du parasite sont fixées sur elle ; il faut compter environ 500 billes et l'épreuve est considérée comme positive si le nombre de billes porteuses de spores est supérieur d'au moins 100 à celui qu'on obtient avec des parasites incubés en sérum témoin [13].

### ***2.6.2.1.6 Avantages et inconvénients des méthodes sérologiques***

La sérologie a pour but de détecter et quantifier les anticorps. Cette méthode est raisonnablement utilisable pour les animaux de laboratoire parce que le niveau d'anticorps reste élevé si les animaux sont infectés de manière chronique et parce que l'exposition environnementale est limitée. Cependant, chez tous les autres animaux, la sérologie est controversée car on ne sait pas si le résultat positif est corrélé à une infection chronique, une infection passée, une infection sub-clinique ou, selon le test, à une réaction croisée avec une autre microsporidie [10, 25, 28]. De plus, chez les lapins excessivement infectés, il n'y a pas de corrélation entre le titre en anticorps sériques et les conséquences sur l'organisme ou l'intensité des lésions trouvées à l'autopsie [22]. C'est pourquoi des méthodes d'identification directe sont typiquement utilisées pour diagnostiquer les microsporidioses [10, 28], même si les tests sérologiques peuvent être un outil diagnostique intéressant chez les lapins montrant des signes compatibles avec une encéphalitozoonose [23]. Enfin, chez un lapin adulte, seul un résultat négatif permet de conclure en excluant l'hypothèse d'encéphalitozoonose [23].

Dans le cadre de lapins de laboratoire, il suffit de savoir si la colonie est indemne ou non. Donc les tests sérologiques sont suffisants. Ils sont même tout à fait adaptés pour le suivi sanitaire périodique des lapins de laboratoires tel qu'il est recommandé par la fédération des associations européennes de la science des animaux de laboratoire (FELASA) [28]. Les tests sérologiques pourraient ainsi permettre de mettre en place un plan d'éradication chez les lapins de laboratoire et les lapins d'élevages [7].

Une question importante dans la compréhension de l'infection à *Encephalitozoon cuniculi* chez le lapin est : que se passe-t-il après l'infection aiguë ? La grande majorité des infections aiguës est asymptomatique. Il est généralement supposé que ces lapins infectés asymptomatiques restent continuellement infectés par le microorganisme, mais qu'il est seulement présent chez le lapin à un très bas niveau. Les conséquences sur la concentration en anticorps circulants de ces lapins n'est pas connu. Il n'est pas non plus connu pourquoi la maladie peut être amenée à se développer plus tard dans la vie et ce qui se passe sur la concentration en anticorps circulants avec le développement de la maladie. Il est donc nécessaire d'examiner les données cliniques chez les lapins naturellement infectés pour déterminer l'utilité de la sérologie comme indicateur de l'encéphalitozoonose [22].

## **2.6.2.2 Recherche des spores**

### ***2.6.2.2.1 Mise en évidence ante mortem***

Pour les animaux montrant des signes cliniques d'encéphalitozoonose, la mise en évidence de spores d'*Encephalitozoon cuniculi* dans les urines, les selles, les sécrétions respiratoires ou le liquide cébrospinal peut amener à un diagnostic ante-mortem [10, 46], mais il peut s'agir d'une maladie concomitante. De faux négatifs peuvent également apparaître car l'excrétion de spores n'est pas continue.

Les deux méthodes de coloration histochimique les plus utilisées pour détecter des microsporidies dans les fluides sont la technique de WEBER (coloration de trichrome modifiée) [47] et l'utilisation d'un agent chimiofluorescent. La coloration de trichrome modifiée emploie le chromotrope 2R, le vert lumière et l'acide phosphotungstique. Les spores de microsporidies sont colorées en rose avec une vacuole postérieure claire, une bande diagonale rose à l'intérieur de la spore et un fond contre-coloré en vert ou en bleu. Les agents chimiofluorescents (Calcofluor White, Uvitex 2B, Fungifluor...) ont une forte affinité pour la chitine et la microsporidie colorée apparaît comme un halo ovale turquoise vif sous une illumination ultraviolette. Ces deux méthodes semblent avoir la même sensibilité (80-100% selon les études et les laboratoires), et l'utilisation parallèle des deux méthodes est conseillée pour optimiser la sensibilité lorsque le nombre de microspores est faible [10, 42, 45, 47].

### ***2.6.2.2.2 Mise en évidence histopathologique***

Un diagnostic définitif d'encéphalitozoonose est souvent impossible du vivant de l'animal, mais l'infection peut être suspectée compte tenu de la clinique [22], plus ou moins associée à une séropositivité ou à la mise en évidence de spores de *Encephalitozoon cuniculi* dans les urines, les selles, les sécrétions respiratoires ou le liquide cébrospinal. De plus, parce que la réponse sérologique précède l'apparition des lésions, le diagnostic histopathologique peut être faussement négatif [12]. Il est également intéressant de multiplier le nombre de coupes car les lésions sont dispersées et peuvent ne pas apparaître sur certains échantillons [12].

Comme nous l'avons vu précédemment, l'examen en microscopie optique des échantillons de tissu et l'utilisation de colorants spécifiques peuvent aider le pathologiste dans la détection de l'infection, et la différenciation de l'infection microsporidienne d'autres infections dues à des protozoaires communs chez les animaux, notamment à *Toxoplasma gondii*. Cependant, même la microscopie électronique n'est pas suffisante pour une identification spécifique des



microsporidies, en particulier chez l'homme, qui peut être infecté par de nombreuses microsporidies différentes [46]. Cf infra 3.2.1 Les agents de microsporidies chez l'homme. L'analyse histopathologique permet non seulement de mettre en évidence les spores, mais aussi d'observer des lésions caractéristiques.

### **2.6.2.3 Méthodes moléculaires [11]**

#### ***2.6.2.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Afin de distinguer les trois espèces du genre *Encephalitozoon* (*Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*) les méthodes immunologiques (ELISA) ne sont pas suffisantes. La PCR, en revanche, permet de les identifier. Cette technique permet d'isoler une séquence particulière du génôme et de l'amplifier un grand nombre de fois, de sorte qu'on considère que la quantité de génôme entier de départ est négligeable en comparaison du nombre d'exemplaires de la séquence que l'on a obtenu. Dans le cas des microsporidies, on amplifie les gènes ribosomiaux, à raison d'une séquence d'environ 1000 paires de bases. Cette séquence inclut une large portion du gène de la petite sous-unité d'ARNr. Les amorces utilisées font que l'amplification est spécifique de la microsporidie recherchée. Après purification de l'ADN, ce dernier est incubé avec une enzyme, la Taq polymérase, qui polymérise l'ADN, les amorces qui délimitent la région à amplifier et un tampon adapté. L'ADN est d'abord dénaturé par chauffage, puis le cycle se poursuit par l'hybridation des amorces, et l'élongation du nouveau brin par l'ADN-polymérase. Le cycle est recommencé en moyenne 30 fois. On a ainsi multiplié le fragment bordé par les amorces.

#### ***2.6.2.3.2 Migration sur gel***

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

#### ***2.6.2.3.3 Autres techniques***

Les produits de la PCR peuvent être soumis aux techniques de RFLP (PCR Restriction Fragment Length Polymorphism) : les produits de la PCR sont digérés toute une nuit avec une

endonucléase puis les fragments sont séparés par l'électrophorèse, colorés avec du bromure d'éthidium et photographiés sous éclairage UV.

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

#### **2.6.2.4 Epreuve cutanée**

Le diagnostic ante mortem pourrait être établi par une épreuve d'hypersensibilité cutanée de nature cellulaire : l'intradermoréaction retardée (lecture à 24, 48 et 72 heures). Elle serait surtout positive en cas d'encéphalitozoonose déclarée chez des sujets présentant des signes cliniques [13]. L'antigène utilisé est un broyat de spores [20]. Cette épreuve est spécifique et il n'y a pas de réaction croisée avec *Eimeria* sp et *Toxoplasma gondii* [44].

### **2.7 Pronostic**

La sévérité des signes cliniques est le meilleur indicateur pronostique. En règle générale, les lapins qui continuent à manger d'eux-mêmes ont de bonnes chances de survivre [23].

Le pronostic du torticolis chez le lapin n'est pas bon et le fait qu'*Encephalitozoon cuniculi* peut être transmis à l'homme apporte une raison supplémentaire à l'euthanasie des lapins de laboratoire et d'élevage [29]. L'encéphalitozoonose oculaire aboutit généralement à la perte de l'œil mais le pronostic vital n'est pas mis en jeu [27, 49].

### **2.8 Moyens de lutte**

#### **2.8.1 Traitement**

Il existe de nombreuses publications à propos du cycle et des tests diagnostiques pour *Encephalitozoon cuniculi*, mais il y a très peu de données scientifiques sur des protocoles thérapeutiques efficaces. Les lapins de laboratoire infectés sont sacrifiés, donc la plupart des

informations publiées sont basées sur des études *in vitro* ou des extrapolations de cas humains. En dépit de la prévalence du parasite, il n'y a pas de produits avec autorisation de mise sur le marché pour le traitement d'*Encephalitozoon cuniculi* chez le lapin [22].

Le traitement de l'encéphalitozoonose est aussi problématique que son diagnostic. Les signes cliniques ne sont pas seulement reliés à la présence du parasite, mais aussi à la réaction inflammatoire qu'il provoque. Des signes nerveux ou rénaux peuvent être présents depuis longtemps et être dus à une inflammation granulomateuse. Même si le parasite est encore dans les tissus, le tuer avec un traitement antiparasitaire ne traitera pas les changements apparus avec la chronicité de la maladie [14, 22, 23]. Au contraire, certains cas cliniques guérissent spontanément sans traitement, certainement grâce à la réponse immunitaire de l'hôte. Il est donc difficile d'évaluer l'efficacité d'un traitement. L'estimation de la sévérité des signes cliniques est très subjective. Le jugement peut être basé sur l'opinion du propriétaire qui voit que son lapin va mieux [22, 23].

Le traitement a pour but d'éliminer le parasite, de supprimer la réaction inflammatoire et de traiter symptomatiquement les signes cliniques. Différentes thérapies ont été utilisées pour tuer le parasite, bien qu'il soit difficile de prouver leur efficacité [22]. Il a été suggéré qu'aucune molécule ne pouvait éliminer les parasites des tissus infectés [5, 19, 20, 22, 35].

Une antibiothérapie immédiate est recommandée pour les lapins qui présentent des signes de syndrome vestibulaire car le principal diagnostic différentiel est à faire avec une infection ascendante à *Pasteurella multocida* [23].

## **2.8.1.1 Élimination du parasite**

### **2.8.1.1.1 Albendazole**

L'albendazole (méthyl[5-(propylthio)-1-H-benzimidazol-2-yl]carbamate) est un anthelminthique dont les effets consistent à bloquer la division cellulaire en se fixant sur les sites colchicine-sensibles des dimères de tubulines avec pour conséquence une inhibition de la polymérisation des microtubules et finalement le blocage de la division cellulaire [6, 36].

Les études *in vitro* montrent que l'albendazole est un agent antimicrosporidien efficace et qu'il peut tuer les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* dans les cultures cellulaires de rein de lapin sans mise en évidence d'effet cytopathique. Bien que cette molécule ne soit que parasitostatique, elle présente l'avantage d'être absorbée par voie orale et c'est le traitement de choix des humains [22]. L'utilisation de l'albendazole dans le traitement de

l'encéphalitozoonose chez le lapin est d'ailleurs extrapolée du traitement utilisé chez l'homme [23, 40, 41].

La posologie et la durée du traitement contre l'encéphalitozoonose ne sont pas déterminées chez le lapin. HARCOURT-BROWN (2004) [22] utilise une dose empirique (20 mg/kg) d'albendazole pendant 3 à 14 jours, mais les humains immunodéprimés (SIDA) requièrent un traitement à vie. De même chez la souris, un arrêt du traitement conduit à une réapparition des symptômes et à la perte des animaux [6, 36]. Ceci est probablement dû à une infection latente persistante, comme le prouve le faible taux d'anticorps [36] et la disparition des spores dans les urines [23], mais on ne peut exclure une réinfestation à partir de l'environnement [6].

La molécule paraît sans danger, mais elle est à utiliser avec attention car l'albendazole a montré des effets embryotoxiques et tératogènes [22, 41]. Un traitement un peu plus dosé (25 mg/kg/j) et/ou plus long (30 jours) peut être nécessaire pour éliminer les signes cliniques et prévenir leur réapparition [22].

L'albendazole n'a pas d'AMM pour les lapins, et, selon le principe de la cascade, il ne peut être utilisé que chez les lapins de compagnie et pas chez les lapins destinés à la consommation humaine [23].

#### **2.8.1.1.2 Fenbendazole**

Comme l'albendazole, le fenbendazole est rapidement métabolisé en oxfendazole. Ses avantages sont que, contrairement à l'albendazole, il n'a pas d'effet secondaire, en particulier, il n'est ni embryotoxique ni tératogène [41]. Un inconvénient potentiel du fenbendazole est son absorption orale légèrement inférieure à celle de l'albendazole [22].

Le fenbendazole peut être utilisé en traitement de l'encéphalitozoonose à la posologie de 20 mg/kg/jour pendant 4 semaines. Ceci est confirmé par les expériences de SUTER *et al* (2001) [41] :

Parmi 17 lapins infectés naturellement, *Encephalitozoon cuniculi* a été isolé du cerveau de 7 des 9 lapins non traités, mais le parasite n'a été identifié chez aucun des 8 lapins traités par du fenbendazole (20mg/kg/jour en aliment médicamenteux pendant 4 semaines). Le fait que le traitement ait éliminé les étapes tissulaires du parasite est prouvé par la réduction du nombre de spores qui devient inférieur au seuil de détection chez tous les lapins traités.

Dans une étude préliminaire, 16 lapins présentant des signes neurologiques attribués à l'encéphalitozoonose (les autres causes diagnostiques ayant été éliminées) possédant un

titre en anticorps inférieur à 1/640, ont été traités par un aliment médicamenteux apportant 20mg/kg/j de fenbendazole pendant 4 semaines. Huit animaux n'avaient plus de signes neurologiques à la fin du traitement, mais 3 montraient quelques signes résiduels. Chez 2 de ces animaux, un léger torticolis a persisté durant la durée de l'expérience de 3 mois, mais le troisième ne présentait alors plus de signes neurologiques. Cinq lapins ont faiblement répondu au traitement, et à cause de la sévérité de la maladie, 2 ont été euthanasiés pendant le traitement et 3 à la fin du traitement. Chez ces lapins, il semble que les lésions inflammatoires associées à l'infection à *Encephalitozoon cuniculi* du système nerveux central étaient trop sévères pour être résolues ou compensées pendant cette durée.

#### **2.8.1.1.3 Oxytétracycline**

L'oxytétracycline est une autre molécule qui a été utilisée pour le traitement des cas cliniques d'encéphalitozoonose [14, 22, 23]. En 1999, EWRINGMANN et GÖBEL [14] utilisent l'oxytétracycline pour traiter les lapins séropositifs pour *Encephalitozoon cuniculi* avec des signes nerveux centraux. La sélection est basée sur des études *in vitro* de la sensibilité de *Encephalitozoon cuniculi* à cet antibiotique. Cependant, l'efficacité de ce traitement, n'est pas complètement connue. Bien que les lapins qui ont bien répondu à ce traitement soient positifs, il n'a pas pu être prouvé que les signes que présentaient ces lapins résultaient de l'infection à *Encephalitozoon cuniculi*. De plus, seulement 50% des lapins de cette étude ont répondu au traitement [22, 23].

#### **2.8.1.1.4 Fumagilline**

La fumagilline est un antibiotique produit par le champignon *Aspergillus fumigatus* [10] utilisé de façon extensive contre la microsporidie *Nosema apis* chez les abeilles [20]. Il semble que cette molécule agisse en inhibant la multiplication du parasite, mais elle n'aurait pas d'effet toxique direct sur les spores, même si elle en altérerait la paroi [13]. Ce médicament aurait donc un intérêt si le traitement est très précocement mis en œuvre. *In vitro*, on a montré son action inhibitrice sur le développement du parasite [20]. La fumagilline est utilisée chez l'homme en topique sur les kératoconjunctivites sèches dues à une encéphalitozoonose. Un analogue de la fumagilline, TNP-470 (également appelé AGM-1470), moins toxique pour les animaux de laboratoire, est aussi efficace *in vitro* que la fumagilline sur certaines microsporidies [10].

#### **2.8.1.1.5 Itraconazole**

Cet antifongique aurait amélioré chez un patient atteint du SIDA une kératite à *Encephalitozoon* [20].

#### **2.8.1.1.6 Métronidazole**

Il a été utilisé chez l'animal de compagnie, mais aussi chez l'homme, avec un certain succès dans le cas d'*Enterocytozoon bieneusi* [9].

#### **2.8.1.1.7 Lufénuron**

*Encephalitozoon cuniculi* est un eucaryote mais sa paroi contient de la chitine. Ceci a autorisé les chercheurs à tester le lufénuron, un inhibiteur de la chitine synthétase. Les essais *in vivo* n'ont cependant pas montré d'effet thérapeutique [22].

### **2.8.1.2 Corticoïdes**

De hautes doses de corticostéroïdes ont été suggérées pour les signes neurologiques aigus associés à *Encephalitozoon cuniculi* dans le but de supprimer la réponse inflammatoire associée à la rupture cellulaire. Les corticostéroïdes ont été utilisés avec succès pour traiter l'encéphaloméningite granulomateuse dans d'autres espèces et EWRINGMANN et GÖBEL (1999) [14] ont observé 50% de retour à la normal en réponse au traitement glucocorticoïde administré à des lapins souffrant d'encéphalitozoonose du système nerveux central. Cependant, à long terme, la corticothérapie peut être contre-indiquée chez les lapins à encéphalitozoonose à cause de l'effet immunosuppresseur. Chez l'homme, les signes cliniques d'encéphalitozoonose n'apparaissent que chez des patients immunodéprimés et, expérimentalement, l'encéphalitozoonose est fatale chez les lapins qui ont été immunodéprimés par les cyclophosphamides. En guise de compromis, une dose unique de corticoïdes à durée d'action courte (par exemple 1-2mg/kg de dexaméthasone) peut être donnée à des lapins qui ont récemment développé des signes neurologiques aigus. Si un traitement supplémentaire est nécessaire, une dose de 0,2mg/kg de dexaméthasone est suggérée [14], mais des agents anti-inflammatoires alternatifs comme la flumixine méglumine ou les anti-Cox-2 sont à considérer [22, 23, 41].

Afin d'améliorer le traitement clinique de l'encéphalitozoonose chez le lapin, la combinaison anti-microsporidien et glucocorticoïdes semble être intéressante [14, 22, 23, 41].

### **2.8.1.3 Traitement symptomatique**

L'ajout d'un traitement symptomatique dépend des signes cliniques [20].

#### ***2.8.1.3.1 Traitement des signes neurologiques***

Les lapins souffrant d'un syndrome vestibulaire aigu peuvent bénéficier de médicaments qui sont utilisés pour traiter les désordres du labyrinthe chez l'homme. La prochlorpérazine, un dérivé de la phénothiazine avec un effet bloquant  $\alpha$ -adrénergique, peut être utilisée chez l'homme souffrant de vertiges. Elle peut être utilisée chez le lapin (0,2-0,5 mg/kg toutes les 8 heures per os). Les benzodiazépines comme le diazépam (1-2 mg/kg SC ou IV ou midazolam 0,5-2 mg/kg SC ou IV) peuvent aider à supprimer les signes neurologiques aigus, et surtout les attaques. Le midazolam est aussi efficace par voie intra nasale [22].

#### ***2.8.1.3.2 Traitement de l'incontinence urinaire***

Les lapins qui souffrent d'incontinence urinaire souillent leur pénéée par la litière imbibée d'urine. Les urines irritent la peau et causent des urétrites qui amènent le lapin à uriner goutte à goutte, ce qui intensifie l'incontinence. Des analgésiques non stéroïdiens (par exemple carprofène 2-4 mg/kg SC ou IV ou méloxicam 0,1-0,2 mg/kg per os) conjointement à une antibiothérapie locale et parentérale peuvent être indiqués [22].

#### ***2.8.1.3.3 Traitement de l'insuffisance rénale***

Le traitement des lapins insuffisants rénaux chroniques est symptomatique. Garantir une prise de boisson adéquate est important et une fluidothérapie peut être nécessaire. Un régime pauvre en calcium est indiqué car l'excrétion rénale du calcium est détériorée et il y a un risque de minéralisation des tissus mous. L'herbe et la paille contiennent la dose optimale de calcium. La luzerne doit être évitée. Les fruits et légumes sont bénéfiques car ils apportent de l'eau. Les carottes, les pommes et le chou contiennent des niveaux moyens en calcium [22].

#### **2.8.1.3.4 Traitement des signes oculaires**

Il y a des rapports mitigés à propos du traitement des signes oculaires de cataracte et d'uvéïte. EWRINGMANN et GÖBEL (1999) [14] traitent les signes d'uvéïte par 14 jours de traitement d'oxytétracycline systémique et topique et de dexaméthazone. Les corticoïdes et mydriatiques topiques ont un effet léger à nul selon le stade de la maladie [49]. HARCOURT-BROWN (2004) [22] prescrit un traitement antiparasitaire pour les lapins souffrants de cataracte, mais ne traite pas les signes intra-oculaires à moins que soient mis en évidence des signes d'inflammation comme un hypopyon.

Cliniquement, l'inflammation causée par l'uvéïte phacoclastique est progressive et répond mal au traitement, si bien que cela conduit souvent à l'énucléation [23, 27, 49]. Le retrait chirurgical du cristallin par phacoémulsification est également possible mais difficile à cause de l'obstruction de la pupille par du matériel granulomateux [40, 49]. Le lapin est habituellement utilisé pour étudier les effets de certains agents anti-inflammatoires sur les uvéïtes induites par le cristallin (phacolytique et phacoclastique) avec un certain succès ; cependant, ces composés ne permettent pas une utilisation clinique [49].

## **2.8.2 Prophylaxie**

### **2.8.2.1 Prophylaxie sanitaire**

Les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* peuvent résister dans l'environnement 3 à 6 semaines à température ambiante et en milieu sec [10, 13, 22, 23, 35] et la contamination se fait essentiellement par les spores excrétées dans les urines. Elle est donc très dépendante des mesures d'hygiène générale. Ainsi, les caillebotis sont à préférer aux cages, clapis et parcs à parois pleines (tôle, plastic, planche...) où les litières sont rapidement souillées par l'urine [7]. Ces derniers, s'ils ne peuvent être évités, doivent être désinfectés à l'aide de désinfectants classiques (phénol 2%, formol 10%, alcool éthylique 70°...) [20, 22]. De même, les aliments doivent être disposés en hauteur et non sur le sol de la cage, et des biberons à eau peuvent être utilisés [16].

Pour les lapins de laboratoire et d'élevage, l'élimination des animaux séropositifs aboutit assez rapidement à l'éradication de la maladie. Cela peut être effectués par des dépistages toutes les trois semaines avec élimination des animaux positifs [13, 22, 33]. A défaut de tests sérologiques coûteux, le tri des reproductrices jeunes et d'un bon état physiologique permet aussi d'éradiquer la maladie en élevage. Il faut aussi éviter d'introduire des animaux venant



d'élevages contaminés [7]. Enfin, pour les lapins de compagnie, un lapin séropositif montrant des signes d'encéphalitozoonose doit être isolé des autres lapins [22].

### 2.8.2.2 Prophylaxie médicale

Un traitement prophylactique par le fenbendazole (20mg/kg/j) prévient l'installation de parasites. L'intérêt de cette molécule en prophylaxie est justifié par les expériences de SUTER *et al* (2001) [41] :

Deux lapins ont reçu 10 mg/kg deux fois par jour d'une suspension de fenbendazole (Panacur® 10% suspension) 7 jours avant et 21 jours après l'infection expérimentale à *Encephalitozoon cuniculi*. Deux lapins ont reçu 20 mg/kg/24h de fenbendazole contenu dans un aliment médicamenteux 7 jours avant et 2 jours après l'infection. Des lapins infectés dans les mêmes conditions ont servis de témoin. Les 4 lapins infectés expérimentalement par *Encephalitozoon cuniculi* pendant leur traitement au fenbendazole sont restés séronégatifs jusqu'à 120 jours post-infection et *Encephalitozoon cuniculi* n'a pas pu être isolé de leur cerveau (6 mois post-infection). Au contraire, les 4 lapins témoins non traités se sont séroconvertis entre le 23<sup>ème</sup> et le 40<sup>ème</sup> jour et ont développé de hauts titres en anticorps (> 1/640). Des spores d'*Encephalitozoon cuniculi* ont été isolées du cerveau de chacun d'entre eux et se sont développées *in vitro*.

Il est judicieux de traiter par précaution les lapins en contact avec des animaux séropositifs avec un traitement antiparasitaire [22].

### **3 L'encéphalitozoonose chez les autres animaux et chez l'homme**

Les infections à *Encephalitozoon cuniculi* sont rapportées chez d'autres mammifères, dont l'homme, bien qu'une maladie systémique sévère soit rare, sauf chez les individus immunodéprimés [23]. Des infections chez les oiseaux sont également rapportées [18, 23, 46].

#### **3.1 L'encéphalitozoonose chez les animaux**

[20, 46]

Des infections naturelles par *Encephalitozoon cuniculi* sont décrites chez le lapin, la souris, le rat, le rat musqué, le cobaye, le hamster, la musaraigne, la chèvre, le mouton, le porc, le cheval, le chien, le renard (sauvage ou en captivité), le chat, de nombreux carnivores exotiques, chez les primates non humains notamment le singe écureuil et chez certains oiseaux [5, 18, 21, 25, 32, 33, 39, 46].

##### **3.1.1 L'encéphalitozoonose chez les rongeurs**

###### **3.1.1.1 Chez la souris**

L'infection par *Encephalitozoon cuniculi* des souris immunocompétentes, comme chez le lapin, est habituellement subclinique. Des lésions histologiques comme des foyers inflammatoires mononucléaires du foie, des poumons ou du cerveau ont été attribuées à cette infection subclinique. L'infection expérimentale de souris nues athymiques ou sévèrement immunodéprimées est typiquement étendue avec des parasites disséminés par extension directe ou par voie hématogène, selon la voie d'inoculation. Les signes cliniques incluent léthargie, dégénérescence et mort. Les principales lésions nécropsiques incluent hépatomégalie, splénomégalie et des foyers miliaires blancs disséminés dans le foie, la rate, le pancréas, les poumons, le cœur, les reins, le cerveau, le péritoine et la plèvre (granulomes miliaires avec une quantité variable de débris cellulaires et nécrose suppurative). Les parasites peuvent être trouvés libres sans foyer inflammatoire ou à l'intérieur des macrophages, des cellules épithéliales ou endothéliales. Les souris inoculées oralement peuvent présenter des foyers ulcératifs de la muqueuse intestinale qui s'étendent souvent jusqu'à la sous-muqueuse voire la musculature. Le diagnostic différentiel de l'encéphalitozoonose à *Encephalitozoon*

*cuniculi* chez la souris inclut les infections à *Clostridium piliformis* (maladie de Tyzzer), *Corynebacterium kutscheri* (pseudotuberculose), *Pseudomonas aeruginosa*, salmonelles, virus de l'hépatite de la souris, virus ectromelia (mousepox) et les tumeurs hématopoïétiques/lymphoréticulaires [46].

### **3.1.1.2 Chez le cobaye**

Comme pour la souris immunocompétente, l'infection à *Encephalitozoon cuniculi* du cobaye est subclinique. La transmission verticale de l'organisme est supposée possible. Une petite enquête récente sur des cobayes consanguins et non consanguins d'origine différente a révélé une séroprévalence à *Encephalitozoon cuniculi* de plus de 50%. La plupart de ces animaux n'avait pas de lésions macroscopiques ni histologiques de l'infection. Des foyers multifocaux de nécrose du cerveau avec une encéphalite granulomateuse et une néphrite interstitielle avec une nécrose des tubules, régénération et fibrose ont été décrits chez des cobayes infectés [46].

### **3.1.2 L'encéphalitozoonose chez les carnivores**

L'infection naturelle des carnivores par *Encephalitozoon cuniculi* a été surtout décrite dans les fermes d'élevage de renards et chez le chien. La forte mortalité chez le renard bleu (*Alopex lagopus*) due à une encéphalitozoonose enzootique a conduit à d'énormes pertes économiques pour l'industrie de la fourrure dans les pays scandinaves [46]. L'infection du chien domestique a été rapportée en Afrique du Sud (prévalence 18%) [20], aux Etats-Unis et en Angleterre où une prévalence de 13% a été détectée chez les chiens errants [20]. L'encéphalitozoonose pouvait être mise en évidence histologiquement et sérologiquement chez les chiots et les organismes ont pu être isolés avec succès *in vitro* à partir des tissus infectés. Le résultat de la sérologie des parents suggère une récente exposition à *Encephalitozoon cuniculi*. A la différence de l'infection asymptomatique subclinique typiquement rencontrée chez le lapin et les rongeurs immunocompétents, l'encéphalitozoonose est une maladie sporadique, foudroyante chez les carnivores nouveaux-nés. L'infection *in utero* est suspectée comme moyen de transmission chez le renardeau. Les signes cliniques chez le chiot ou le renardeau incluent baisse d'appétit et ralentissement de la croissance, ataxie, tremblements, faiblesse des postérieurs et cécité avec évolution vers un comportement en cercle, une agressivité et des convulsions. Les lésions macroscopiques incluent des traînées radiaires pâles s'étendant du cortex rénal au bassin, et des méninges

œdémateuses et distendues. Des artères épaisses, nécrotiques et tortueuses de taille moyenne à petite (concordant avec une polyarthrite noueuse) sont souvent observées à l'autopsie dans les tissus cardiaque, intestinal et nerveux central chez le renard bleu. Les lésions histologiques chez le chien et le renard incluent une hépatite microgranulomateuse multifocale, une néphrite interstitielle lymphoplasmocytaire, une pneumonie interstitielle et une méningoencéphalite lymphoplasmocytaire avec une calotte périvasculaire et occasionnellement des kystes parasitaires contenant des spores. Les animaux survivants évacuent les parasites dans l'urine. La morbidité et la mortalité varient selon la portée de chiots ou de renardeaux, et les parents restent asymptomatiques. Le diagnostic différentiel de l'encéphalitozoonose du jeune canidé inclut l'herpèsvirus canin, la maladie de Carré, la néosporose, les septicémies à Gram négatifs, l'hydrocéphalie ou d'autres anomalies intracrâniennes et la rage [46, 10, 20].

Chez les félidés, les chatons peuvent être chétifs et en mauvais état général dans les premières semaines de vie. Des spasmes musculaires, de la dépression et une paralysie aboutissant à la mort ont été rapportés. Cependant, l'encéphalitozoonose peut évoluer vers une kératite, accompagnée éventuellement d'un blépharospasme [13, 20, 35].

Dans un élevage de vison, au cours d'une encéphalitozoonose chronique induite par *Encephalitozoon cuniculi*, des lésions de la cornée et du cristallin avec une détérioration graduelle de la vue et même une cécité ont été observées [36].

Enfin, chez les carnivores, l'infection peut se faire par ingestion de proies porteuses de kystes de microsporidies [20].

### **3.1.3 L'encéphalitozoonose chez les primates non humains**

L'infection spontanée par *Encephalitozoon cuniculi* chez les primates non humains est bien documentée chez le singe écureuil (*Saimiri sciureus*). Dans ces études, les singes affectés sont classés en nouveaux-nés (<4 semaines) et jeunes (<9 mois) suspectés d'avoir acquis l'infection *in utero*. Les signes ante mortem sont habituellement absents. Il n'y a qu'un seul cas rapporté de microsporidiose spontanée intestinale, présumée due à *Encephalitozoon cuniculi*, chez un adulte. Il s'agit d'un singe Callicèbe gris (*Callicebus moloch*) qui était immunodéprimé. L'infection à *Encephalitozoon cuniculi* du singe écureuil est typiquement subclinique, et il n'y a pas de lésions macroscopiques apparentes. Les singes écureuils nouveaux-nés, et sans doute immunodéprimés, ont fréquemment des lésions microscopiques dans le système nerveux central. Ces lésions incluent des granulomes multifocaux dans lesquels on observe une méningite non suppurative de la substance grise et de la substance

blanche ainsi qu'une vascularite. Une néphrite interstitielle non suppurative et une pneumonie avec des parasites intralésionnels peuvent également apparaître. Une placentite, caractérisée par un infiltrat inflammatoire mononucléaire et organisé en granulomes, a été décrite. Le diagnostic différentiel de l'encéphalitozoonose chez le singe écureuil comprend en premier lieu l'infection par *Toxoplasma gondii*. L'encéphalitozoonose subclinique a aussi été démontrée histologiquement chez le singe vert (*Cercopithecus pygerythrus*) expérimentalement infecté par *Encephalitozoon cuniculi* isolé à partir d'un chien domestique. Il y a un seul cas d'infection expérimentale de macaques rhésus (*Macaca mulatta*) immunocompétents et immunodéprimés par *Encephalitozoon cuniculi* et *Encephalitozoon hellem*. Les macaques immunodéprimés qui ont reçu *Encephalitozoon hellem* par voie intraveineuse ont montré des spores dans les lésions suppuratives du foie et des reins, alors que les macaques inoculés oralement par *Encephalitozoon hellem* ou *Encephalitozoon cuniculi* ont éliminé des spores périodiquement dans les urines et les selles mais n'ont pas montré de lésions macroscopiques ni microscopiques prouvant l'infection parasitaire [46].

### **3.1.4 L'encéphalitozoonose chez les oiseaux**

Le nombre de microsporidioses spontanées est en augmentation chez les psittacidés, incluant les Inséparables (*Agapornis* spp), les perruches (*Melopsittacus undulatus*) et les perroquets Electus (*Electus roratus*). Dans nombre des premiers rapports, l'agent étiologique était identifié comme *Encephalitozoon cuniculi*, mais les analyses moléculaires ont révélé que l'agent responsable de l'infection des psittacidés le plus souvent rapporté est *Encephalitozoon hellem*. Les oiseaux infectés sont jeunes et fréquemment co-infectés par d'autres pathogènes. Les signes cliniques sont : anorexie, léthargie et retard de développement. Les lésions sont une hépatite nécrotique focale avec des parasites intralésionnels. Les parasites peuvent aussi être identifiés dans les cellules de la muqueuse intestinale, des cryptes et de la lamina propria, des cellules tubulaires rénales et des cellules épithéliales du tractus biliaire, sans réponse inflammatoire associée [46].

### **3.1.5 L'encéphalitozoonose chez les autres animaux**

On dispose de peu d'information sur le portage chez les herbivores. *Encephalitozoon cuniculi* a toutefois été signalé en localisation rénale chez un poulain mort-né et dans le sperme de taureau [20].

## **3.2 L'encéphalitozoonose chez l'homme**

Le premier cas de microsporidiose chez l'homme a été publié en 1959 ; elle concernait un garçon de 9 ans présentant des maux de tête, de la fièvre et des convulsions [10, 13, 20]. Les microsporidioses n'ont été que très rarement rapportées chez l'homme jusqu'au développement de la pandémie du SIDA et, depuis 1985, les microsporidioses ont été reconnues comme des infections opportunistes associées à une diarrhée persistante chez les individus immunodéprimés, en particulier des patients VIH+ et les transplantés [10]. Mais aucune analyse microscopique n'avait confirmé l'origine précise de ces symptômes. Il pouvait donc s'agir d'un *Encephalitozoon*-like [8]. Plus récemment, des cas de diarrhée due à des microsporidies chez des voyageurs et des enfants sains suggèrent que ces infections sont peut-être plus communes qu'on ne le croyait [10].

### **3.2.1 Les agents de microsporidioses chez l'homme**

Bien que *Encephalitozoon cuniculi* soit très répandu dans le monde animal, cette espèce n'est pas la microsporidie la plus fréquemment rencontrée chez l'homme. En effet, avec le développement de techniques diagnostiques plus sophistiquées, le nombre de microsporidies capable d'infecter l'homme s'est élargi et les rapports d'infections humaines ont augmenté. La majorité de ces infections résulte de désordre du tractus digestif et *Enterocytozoon bieneusi* est l'espèce la plus fréquemment identifiée, suivie d'*Encephalitozoon intestinalis* et *Encephalitozoon hellem* [46]. Ces dernières ne sont pas différenciables d'*Encephalitozoon cuniculi* par microscopie optique ou électronique, ce qui explique la possibilité de confusion entre ces espèces [8].

Ce n'est qu'en 1995 qu'une infection à *Encephalitozoon cuniculi*, différenciée d'*Encephalitozoon hellem* par des anticorps monoclonaux, a été identifiée chez un patient VIH+ avec des signes cliniques de sinusite chronique, de rhinite, et de kératoconjonctivite [46]. Un autre *Encephalitozoon*-like appelé *Septata intestinalis*, a également été décrit, provoquant une diarrhée chronique et une maladie systémique chez des patients infectés par le VIH [8].

### **3.2.2 Symptômes induits par *Encephalitozoon cuniculi***

Le plus souvent, *Encephalitozoon cuniculi* provoque chez l'homme des troubles intestinaux (diarrhée sévère, non sanguinolente, non mucoïde, avec des spasmes), rénaux, oculaires

(kérato-conjonctivite, inflammation conjonctivale bilatérale, sensation de corps étranger, sensibilité à la lumière et rougeur oculaire) et neurologiques (signes d'infection cérébrale : fièvre, maux de tête, crises nerveuses) [9, 23, 26]. Des patients souffrant du SIDA montre des signes de péritonite ou d'hépatite induite par une infection à *Encephalitozoon cuniculi*. Les patients infectés par le VIH souffrant d'une infection à *Encephalitozoon cuniculi* peuvent souffrir de nombreuses modifications organiques incluant insuffisance rénale, pneumonie, sinusite et granulomes nécrotiques hépatiques. Dans un cas récent, l'autopsie d'un patient souffrant du SIDA a montré une infection à *Encephalitozoon cuniculi* dans le cerveau. Dans une autre étude, une femme souffrant du SIDA est morte d'une infection microsporidienne nécrotique des glandes surrénales et des reins. Dans ce cas, l'immunofluorescence et l'analyse moléculaire ont permis d'identifier avec certitude *Encephalitozoon cuniculi*. Les investigateurs proposent d'inclure *Encephalitozoon cuniculi* dans le diagnostic différentiel des infections opportunistes des patients souffrant du SIDA. Suite à ces observations, l'institut national des maladies allergiques et infectieuses des Etats-Unis a récemment classé *Encephalitozoon cuniculi* comme un agent infectieux émergent [26].

### 3.2.3 Potentiel zoonotique

Deux isolats d'*Encephalitozoon cuniculi* de chiens se sont révélés appartenir à la souche III avec 4 répétitions de la séquence 5'-GTTT-3' dans le transcrit du gène de l'ARN ribosomal. Ultérieurement, plus de 4 isolats d'humains ont été identifiés comme appartenant à cette même souche III dans le continent Nord Américain (Etats-Unis, Canada) et appartenant à la souche I dans deux rapports en Europe [10, 22, 39]. Une étude, dirigée par SNOWDEN, LOGAN et DIDIER (1999) [39], prolonge ce travail par l'identification de 8 isolats supplémentaires d'*Encephalitozoon cuniculi* souche III chez des chiens. De plus, le nombre d'encéphalitozoonoses chez des animaux domestiques augmente, ce qui renforce cette hypothèse de zoonose [46]. Bien qu'aucune donnée épidémiologique n'ait directement confirmé une transmission du chien à l'homme ni du lapin à l'homme, les données moléculaires suggèrent que les chiens et les lapins peuvent être un réservoir potentiel des parasites pour l'homme [22, 39]. Ainsi, bien que le risque paraisse faible, il convient d'être prudent et de prévenir les propriétaires d'animaux de compagnie (et en particulier du lapin chez qui la prévalence est plus élevée) du risque potentiel sur la santé des personnes immunodéprimées [22]. Il est intéressant de remarquer que les différences géographiques et culturelles des propriétaires d'animaux de compagnies puissent jouer un rôle dans

l'exposition des humains, puisque les chiens sont des animaux de compagnies très courants aux Etats-Unis alors que les lapins sont fréquemment utilisés comme animaux de compagnies ou dans l'alimentation en Europe [39].

Cependant, dans une étude menée par DEPLAZES *et al.* (1996) [8], aucune source d'infection n'a été reconnue pour les patients étudiés, car aucun ne possédait d'animal de compagnies ni n'avait été exposé à des animaux. Comme les spores d'*Encephalitozoon cuniculi* sont résistantes dans l'environnement, les infections ont pu être causées par de l'eau, un aliment ou une autre source contaminée. Le mode de transmission n'a pas encore été déterminé.



## Deuxième partie : étude expérimentale

Si le parasite *Encephalitozoon cuniculi* est bien décrit chez le lapin de laboratoire car il interfère avec la recherche expérimentale, le vétérinaire praticien peut également le rencontrer chez le lapin de compagnie. Le mode de vie des lapins est différent et le risque représenté par les lapins séropositifs pour leurs congénères est difficile à évaluer [23], même si il est fort probable que les lapins vivant dans une même cage se contaminent par ingestion ou inhalation de spores contenues dans la litière souillée par des urines contaminées. De même le risque de transmission à l'homme est mal connu. Selon les enquêtes réalisées en Allemagne et en Angleterre chez le lapin de compagnie [14, 22, 23], entre 45 et 66% des animaux médicalisés (sains ou non) seraient séropositifs, 52% parmi les animaux sains [25 bis]. Ce type d'enquête n'a jamais été réalisé en France. Enfin, l'évaluation sérologique de la prévalence chez les lapins de compagnie et de laboratoire montre des taux en anticorps anti-*Encephalitozoon cuniculi* plus élevés chez les animaux souffrant d'autres affections que chez les animaux sans symptômes cliniques [42, 44].

### 1 Objectifs de l'enquête

Nous nous sommes proposés de réaliser une enquête épidémiologique chez le lapin de compagnie en Région Parisienne. Le premier objectif de ce travail a été de déterminer quelle est la séroprévalence de l'infection par *Encephalitozoon cuniculi*. Nous désirions également préciser l'intérêt et la fiabilité de la sérologie dans le diagnostic de la maladie et vérifier si la séropositivité est plus souvent associée à un (ou des) signe(s) clinique(s) particulier(s). De plus, nous souhaitons comparer un nouvel outil diagnostique, le Dot-Blot de protéines recombinantes d'*Encephalitozoon cuniculi*, avec une méthode utilisée couramment, l'immunofluorescence indirecte. Enfin, une thèse de médecine humaine est menée en parallèle à cette étude afin de préciser quelle est la séroprévalence chez des individus en contact ou non avec des lapins.

## **2 Matériels et méthode**

### **2.1 Nature des prélèvements**

Les lapins de compagnie qui entrent dans cette étude ont subi un prélèvement sanguin pour recherche d'anticorps anti-*Encephalitozoon* sur le sérum. Un prélèvement d'urine aurait été intéressant pour mettre directement en évidence la présence des parasites, mais ce dernier n'était pas réalisable en clientèle.

### **2.2 Lieux et durée des prélèvements**

Les prélèvements ont été effectués par des vétérinaires qui consacrent leur activité à la médecine des Nouveaux Animaux de Compagnie (NAC). Ils sont donc amenés à soigner quotidiennement des lapins de compagnie. Ces vétérinaires exercent tous en Région Parisienne.

#### **2.2.1 Docteur Jean-François QUINTON**

Le Docteur Jean-François QUINTON exerce 47 avenue de la République à Paris (11<sup>ème</sup> arrondissement). Il est à l'initiative de ce travail de recherche sur *Encephalitozoon cuniculi*. Il a effectué un prélèvement sanguin sur, autant que faire se peut, tous les lapins, présentant des symptômes ou non, amenés à sa consultation ou à la consultation NAC de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Il a effectué 97 prélèvements (prélèvements 0 à 32, 34 à 71, 73 à 92 et 101 à 106) entre le 1<sup>er</sup> octobre 2005 et le 30 mai 2006.

#### **2.2.2 Docteur Didier BOUSSARIE**

Le Docteur Didier BOUSSARIE exerce à la clinique vétérinaire de Frégis, 43 avenue Aristide Briand à Arcueil (Val de Marne). Les lapins dont il a prélevé le sang présentent tous des symptômes évoquant fortement une encéphalitozoonose. 12 prélèvements (B1 à B12) ont été effectués entre le 1<sup>er</sup> octobre 2005 et le 30 mai 2006.

### **2.2.3 Docteur Christophe BULLIOT**

Le Docteur Christophe BULLIOT exerce 7 rue Philisbourg à Brunoy (Essonne). En apprenant l'existence de cette enquête, il a rejoint l'équipe de travail. Il a prélevé tous les lapins qui lui ont été présentés entre le 1<sup>er</sup> avril et le 31 mai 2006, soit 15 lapins (C1 à C15).

### **2.3 Réalisation et stockage des prélèvements**

Chaque vétérinaire a son lieu de prélèvement sanguin privilégié. Le Docteur QUINTON prélève à la veine saphène externe, le Docteur BOUSSARIE à la veine jugulaire après un flash anesthésique de gaz isoflurane, et le Docteur BULLIOT à la veine fémorale.

Le sang prélevé est ensuite centrifugé et immédiatement conservé à -20°C. Dans ces conditions, le prélèvement peut être conservé plusieurs mois.

Pendant leur transfert, les échantillons sont stockés dans des glacières contenant des blocs de glace afin de maintenir une température négative.

### **2.4 Recueil des commémoratifs**

Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignements (Tableau 3) remplie par le vétérinaire qui a réalisé la prise de sang.

### Tableau 3 : fiche de commémoratifs

|                                            |                                             |                     |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------|
| Nom du vétérinaire                         | Date :                                      | n° du lapin prélevé |
| <b>Coordonnées du propriétaire :</b>       | <b>Anamnèse et traitements précédents :</b> |                     |
| Tél :                                      |                                             |                     |
| <b>Animal :</b>                            | <b>Motif de consultation :</b>              |                     |
| Age :                                      |                                             |                     |
| Race :                                     |                                             |                     |
| Sexe :                                     |                                             |                     |
| Provenance :                               | <b>Examen clinique :</b>                    |                     |
| Alimentation :                             | Etat général :                              |                     |
| Litière :                                  | Température :                               |                     |
| Autres lapins, dans la même cage ? :       | FC :                                        |                     |
|                                            | FR :                                        |                     |
|                                            | <b>Animal sain :</b> O N                    |                     |
| <b>Symptômes nerveux :</b>                 | <b>Examens complémentaires éventuels :</b>  |                     |
| - Torticolis                               | O                                           | N                   |
| - Ataxie                                   | O                                           | N                   |
| - Parésie                                  | O                                           | N                   |
| - Convulsions                              | O                                           | N                   |
| - Autres (préciser) :                      |                                             |                     |
| <b>Symptômes rénaux :</b>                  | <b>Conclusion :</b>                         |                     |
| - PUPD                                     | O                                           | N                   |
| - Autres (préciser) :                      |                                             |                     |
| <b>Symptômes ophtalmologiques :</b>        | <b>Traitement mis en place :</b>            |                     |
| - Cataracte                                | Œil D                                       | Œil G               |
| - Uvéite                                   | Œil D                                       | Œil G               |
| - Rupture capsule antérieure du cristallin |                                             |                     |
|                                            | Œil D                                       | Œil G               |
| - Hypopyon :                               | Œil D                                       | Œil G               |
| - Autres (préciser) :                      |                                             |                     |
| <b>Autres symptômes (préciser) :</b>       |                                             |                     |
| <b>Suivi 1</b>                             | Date                                        |                     |
| Evolution :                                | Traitement :                                |                     |
| <b>Suivi 2</b>                             | Date                                        |                     |
| Evolution :                                | Traitement :                                |                     |

## **2.5 Réalisation des analyses**

Les anticorps (Ig totales ou anticorps spécifiques de certaines protéines) sont recherchés selon deux méthodes. Ces analyses ont été dirigées par Christian VIVARES et Frédéric DELBAC et réalisées par Ivan WAWRZYNIAK et moi-même à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (Université des Cézeaux), Equipe Parasitologie Moléculaire et Cellulaire, 24, avenue des Landais à Aubière (Puy de Dôme).

### **2.5.1 Immunofluorescence indirecte**

Tous les sérums ont d'abord été analysés par immunofluorescence indirecte afin d'effectuer un premier criblage. Cette méthode diagnostique est utilisée couramment mais elle est lourde à réaliser puisqu'elle nécessite la culture cellulaire d'*Encephalitozoon cuniculi*. Elle présente également l'inconvénient de révéler la présence d'anticorps induits par les autres microsporidies du genre *Encephalitozoon* (réactions croisées) puisqu'elle met en évidence les Ig totales.

Cette méthode, étant l'une des plus utilisées en routine, est utilisée dans notre enquête pour les calculs de séroprévalence et comme test de référence.

Cette analyse est effectuée deux fois afin de confirmer les résultats et de minimiser les conséquences des éventuelles erreurs techniques.

### **2.5.2 Dot- Blot**

L'immunofluorescence indirecte est suivie de deux immuno-empreintes, à partir de protéines recombinées chez *Escherichia coli*. Ces protéines permettent de mettre en évidence des anticorps spécifiques d'*Encephalitozoon cuniculi* et ainsi d'éviter les réactions croisées avec d'autres espèces du genre *Encephalitozoon* (*Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*).

#### **2.5.2.1 Principe**

Le principe de base est semblable à celui de l'immunofluorescence. Le but est de fixer les anticorps recherchés entre, d'une part, une protéine spécifique d'*Encephalitozoon cuniculi* déposée sur une membrane, et, d'autre part, des anticorps liés à une enzyme qui, au contact

avec un substrat, se colore. Si le test est positif (présence d'anticorps spécifiques), la coloration est observable.

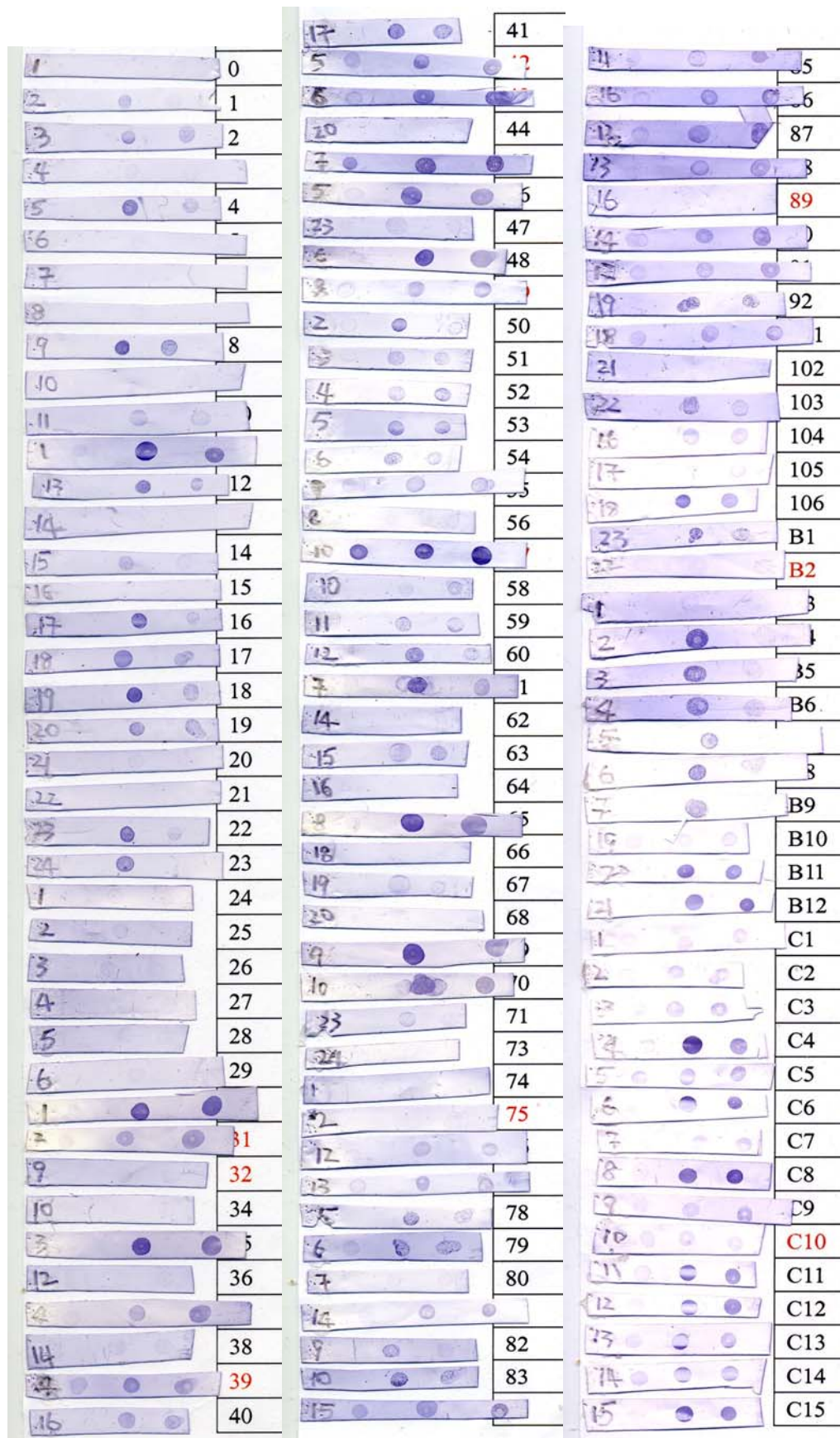
La différence tient particulièrement au fait que l'antigène utilisé n'est plus une suspension de spores (soit de nombreux antigènes), mais une protéine recombinante, exprimée chez *Escherichia coli*, antigène unique spécifique d'*Encephalitozoon cuniculi*. Plusieurs protéines spécifiques ont été identifiées, notamment PTP-1, PTP-2 et PTP-3, protéines du tubule polaire, et SWP-1, protéine de l'exospore (moins immunogène que les protéines du tubule polaire). Seules PTP-1 et SWP-1 sont utilisées sur les sérums des lapins prélevés.

### **2.5.2.2 Réalisation**

Pour synthétiser chacune de ces protéines, le gène codant correspondant est amplifié par PCR puis injecté par l'intermédiaire d'un plasmide dans une bactérie vecteur d'expression qui va transcrire et traduire le gène après induction (promoteur inductible à l'IPTG). Le gène est entouré d'une séquence GST en N-terminal et de 8 codons codant pour l'histidine en C-terminal. Après 4-5 h d'incubation, le milieu de culture est centrifugé. Pour le Dot-Blot sur protéines totales, les protéines sont utilisées brutes, c'est-à-dire que la protéine d'intérêt reste associée aux protéines nécessaires à sa synthèse (protéines de la bactérie vecteur...). Pour le Dot-Blot sur protéines purifiées, les protéines sont purifiées et extraites sur colonnes de nickel grâce à leurs nombreux acides aminés histidine. Les protéines ainsi obtenues sont soumises à une migration sur gel avant leur utilisation pour vérifier que la taille du produit est bien celle attendue. Les protéines sont ensuite déposées sur une membrane. Ces protéines (totales ou purifiées) sont au nombre de trois dans notre expérience : (de gauche à droite) GST (témoin négatif), PTP-1, SWP-1. Le sérum de l'animal à tester est ensuite mis à incuber avec la membrane une heure à température ambiante. Après trois rinçages de 5 minutes au PBS triton, des anti-immunoglobulines de lapin liées à une enzyme, la phosphatase alcaline, sont mises à incuber avec la membrane pendant une heure à température ambiante. Après encore trois rinçages, les résultats sont révélés par le NBT-BCIP dans du tampon AP et la réaction est arrêtée après une minute trente avec de l'eau. Les Dot-Blot positifs apparaissent en bleu, les négatifs ne sont pas colorés (Figure 7).

Les prélèvements ayant été envoyés au laboratoire en deux fois, le premier lot est soumis aux deux Dot-Blot alors que le second lot n'est soumis qu'au Dot-Blot sur protéines purifiées.

Figure 7 : Résultats des DOT-BLOT sur protéines purifiées. Les protéines déposées sur la membrane sont de gauche à droite : GST, PTP-1, SWP-1. (Cliché I. WAWRZY尼亚K)



### **2.5.2.3 Interprétation**

Les lapins ne réagissant à aucune des protéines sont négatifs : ils ne possèdent pas d'anticorps spécifiques d'*Encephalitozoon cuniculi* dans leur sérum. C'est le cas, par exemple du lapin 8.

Les lapins réagissant pour les trois protéines avec la même intensité sont douteux. En effet, ils réagissent pour le promoteur des protéines (GST) donc il est impossible de savoir si la positivité pour PTP-1 et/ou SWP-1 est due à la fixation sur la partie GST ou sur la partie spécifique d'*Encephalitozoon cuniculi*. C'est le cas, par exemple, du lapin 39. Cependant, lorsque la réaction pour la GST est plus faible que pour PTP-1 et SWP-1, la réaction est tout de même considérée comme positive, la révélation a très probablement été trop longue. C'est le cas du lapin C11. Ceci est confirmé par la répétition des analyses.

Les lapins ne réagissant pas pour la GST mais pour PTP-1 et SWP-1 sont séropositifs : ils possèdent des anticorps spécifiques d'*Encephalitozoon cuniculi* dans leur sérum. C'est le cas, par exemple, du lapin B11.

## **2.6 Répartition en lots**

Après avoir calculé la séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi* sur la population de lapins de compagnie (à partir des lapins tout venant prélevés par les Docteurs QUINTON et BULLIOT, soit 112 lapins), les lapins sont répartis successivement en plusieurs lots afin de déterminer une éventuelle relation entre séropositivité pour *Encephalitozoon cuniculi* et encéphalitozoonose, ainsi qu'un ou plusieurs éventuels facteurs prédisposant à la séropositivité.

### **2.6.1 Par symptômes**

#### **2.6.1.1 Symptômes évocateurs d'encéphalitozoonose**

Afin de déterminer une éventuelle relation entre séropositivité pour *Encephalitozoon cuniculi* et encéphalitozoonose, les 124 lapins sont répartis en deux lots : d'une part les lapins présentant des signes cliniques évocateurs d'encéphalitozoonose (donc issus des 3 clientèles et comprenant les lapins prélevés par le Docteur BOUSSARIE) et d'autre part tous les autres lapins. Les lapins appartenant au premier lot présentent tous au moins un signe clinique évocateur d'encéphalitozoonose, c'est-à-dire des signes neurologiques : torticolis, ataxie, parésie, convulsions..., des signes rénaux avec augmentation de l'urémie et de la



créatininémie, polyuro-polydypsie, et/ou des signes oculaires : uvéite phacoclastique, cataracte, hypopyon.

### **2.6.1.2 Différents groupes de symptômes cliniques**

Afin de déterminer si la séropositivité est plus souvent associée à un (ou des) signe(s) clinique(s) particulier(s) indépendamment de l'évocation d'encéphalitozoonose, les lapins sont répartis en 7 lots :

- les lapins sains (visite de routine, vaccination, chirurgie de convenance...),
- les lapins présentant des signes nerveux (évocateurs ou non d'encéphalitozoonose),
- les lapins présentant des signes digestifs (anorexie, diarrhée, iléus...),
- les lapins présentant des signes dentaires (malocclusion, abcès dentaire...),
- les lapins présentant des signes oculaires (évocateurs ou non d'encéphalitozoonose comme une conjonctivite par exemple),
- les lapins présentant des troubles respiratoires (éternuements, dyspnée...),
- les lapins ne pouvant être classés dans aucune des catégories précédemment citées.

### **2.6.2 Par sexe**

Afin de déterminer une éventuelle prédisposition sexuelle comme il semblait apparaître dans l'enquête de HARCOURT-BROWN en 2004 [22], les animaux sont répartis en deux lots : mâles et femelles.

### **2.6.3 Par âge**

Afin de déterminer si le parasite *Encephalitozoon cuniculi* infecte plus particulièrement une classe d'âge, les lapins sont répartis en 5 lots :

- les lapins âgés de moins de 2 ans (< 2 ans),
- les lapins âgés de 2 ans à 4 ans ([2;4[ ans),
- les lapins âgés de 4 ans à 6 ans ([4;6[ ans),
- les lapins âgés de 6 ans à 8 ans ([6;8[ ans),
- les lapins âgés de 8 ans et plus (> 8 ans).

## **2.7 Analyse des résultats**

Les formules ayant permis l'analyse statistique des résultats proviennent de l'ouvrage de TOMA *et al.*, paru en 2002 (2<sup>ème</sup> édition), intitulé « Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures » [43 bis].

### **2.7.1 Calcul de la prévalence de l'échantillon et extension à la population**

La **prévalence** (**p**) de l'échantillon est le nombre total de cas (dans notre étude de lapins séropositifs en immunofluorescence) dans une population déterminée de **n** individus (les lapins tout venant prélevés au hasard de leur venue à la consultation) au cours d'une période déterminée.

Le calcul de l'intervalle à 95% est ensuite calculé en vue de l'extrapolation de ce résultat à la population des lapins de compagnie médicalisés d'Ile-de-France.

### **2.7.2 Comparaison des différents lots**

Les différents lots sont comparés grâce au test du  $\chi^2$ . Lorsqu'un (ou plusieurs) effectif(s) théorique(s) est inférieur à 5, le test exact de Fisher est utilisé.

### **2.7.3 Comparaison des différents tests**

L'immunofluorescence, couramment utilisée, sert de test de référence pour calculer la spécificité, la sensibilité ainsi que les valeurs prédictives positive et négative des Dot-Blot et ainsi en évaluer la validité.

## 3 Résultats

### 3.1 Séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi*

#### 3.1.1 Parmi les lapins tout venant

Parmi les 112 lapins prélevés au hasard de leur venue (lapins tout venant prélevés par les Docteurs QUINTON et BULLIOT), 77 lapins ont présentés une réponse positive à l'immunofluorescence (soit 69%) et 35 lapins ont présentés une réponse négative (soit 31%).

**La séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi* dans la population des lapins de compagnie médicalisés d'Ile-de-France a pu être ainsi estimée à 69% +/- 9%.**

#### 3.1.2 Répartition par symptômes

##### 3.1.2.1 Symptômes évocateurs d'encéphalitozoonose

Parmi les 124 lapins prélevés pour l'étude, 36 lapins (soit 29%) présentent des signes cliniques pouvant évoquer une encéphalitozoonose. Parmi ces lapins, 29 (soit 81%) fournissent une réponse positive en immunofluorescence et 7 (soit 19%) une réponse négative.

Parmi les 88 lapins ne présentant pas des signes cliniques pouvant évoquer une encéphalitozoonose, 58 (soit 66%) fournissent une réponse positive en immunofluorescence et 30 (soit 34%) fournissent une réponse négative.

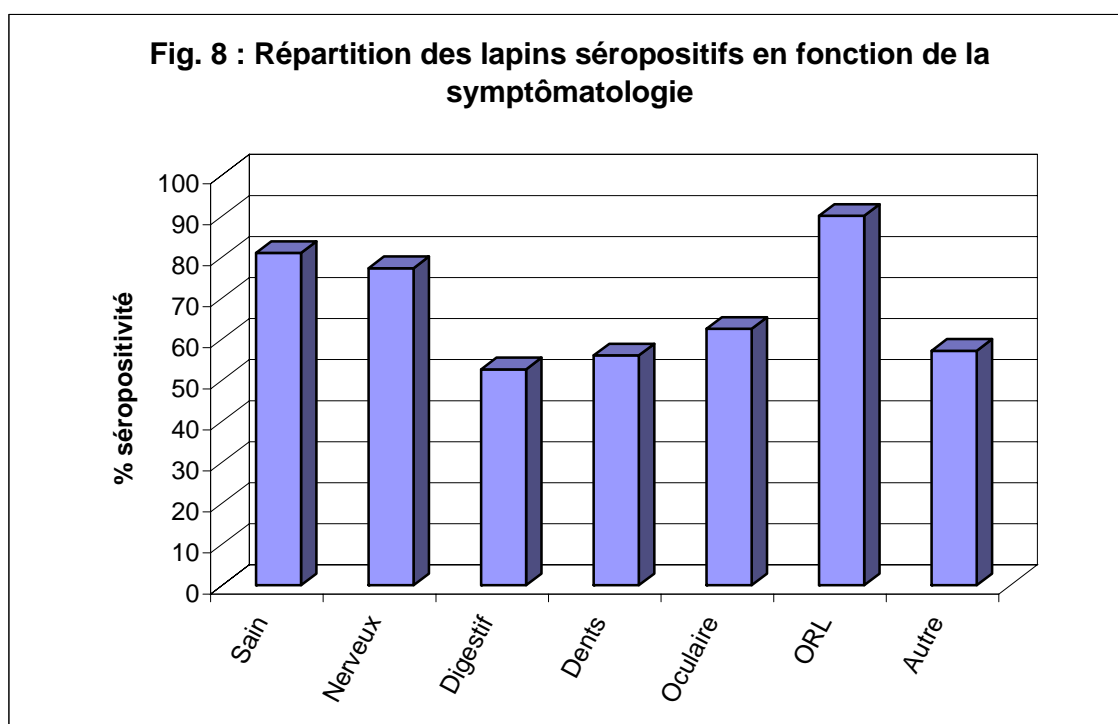
La valeur du  $\chi^2$  étant de 2,62, la différence n'est pas significative au seuil de 5% et peut donc être imputée aux fluctuations d'échantillonnage.

**La séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi* n'est pas significativement différente pour les lapins présentant des signes cliniques évocateurs d'encéphalitozoonose ou non.**

##### 3.1.2.2 Différents groupes de symptômes cliniques

Parmi les 112 lapins dont le clinique est connue, on observe 7 groupes de symptômes qui se répartissent comme suit (Figure 8) :

- 21 lapins sains dont 17 (81%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 22 lapins présentant des signes nerveux dont 17 (77%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 19 lapins présentant des signes digestifs dont 10 (53%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 25 lapins présentant des signes dentaires dont 14 (56%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 8 lapins présentant des signes oculaires dont 5 (63%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 10 lapins présentant des troubles respiratoires dont 9 (90%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 7 lapins ne pouvant être classés dans les catégories précédemment citées dont 4 (57%) répondent positivement à l'immunofluorescence.



Chaque lot est comparé à tous les autres lapins. Lorsque le test du  $\chi^2$  n'est pas applicable car plusieurs valeurs sont inférieures à 5, la loi exacte de Fisher est appliquée. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Résultats des tests statistiques pour la répartition  
des lapins en fonction de leur symptomatologie**

| <b>Lot</b>      | <b>Test utilisé</b> | <b>Résultats</b> | <b>Interprétation</b>        |
|-----------------|---------------------|------------------|------------------------------|
| <b>Sain</b>     | Fisher              | p = 0,19         | Différence non significative |
| <b>Nerveux</b>  | $\chi^2$            | $\chi^2 = 1,11$  | Différence non significative |
| <b>Digestif</b> | $\chi^2$            | $\chi^2 = 2,43$  | Différence non significative |
| <b>Dents</b>    | $\chi^2$            | $\chi^2 = 2,07$  | Différence non significative |
| <b>Oculaire</b> | Fisher              | p = 0,71         | Différence non significative |
| <b>ORL</b>      | Fisher              | p = 0,163        | Différence non significative |
| <b>Autres</b>   | Fisher              | p = 0,678        | Différence non significative |

Les différences entre les lots ne sont pas significatives au seuil de 5% et peuvent donc être imputées aux fluctuations d'échantillonnage.

**Quelle que soit la clinique, la séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi* n'est pas significativement différente.**

### **3.1.3 Répartition par sexe**

Parmi les 105 lapins dont le sexe est connu (omission dans le remplissage de la fiche de renseignements), 35 sont des femelles et 70 sont des mâles. 22 femelles (soit 63%) et 52 mâles (soit 74%) ont fourni une réponse positive à l'immunofluorescence.

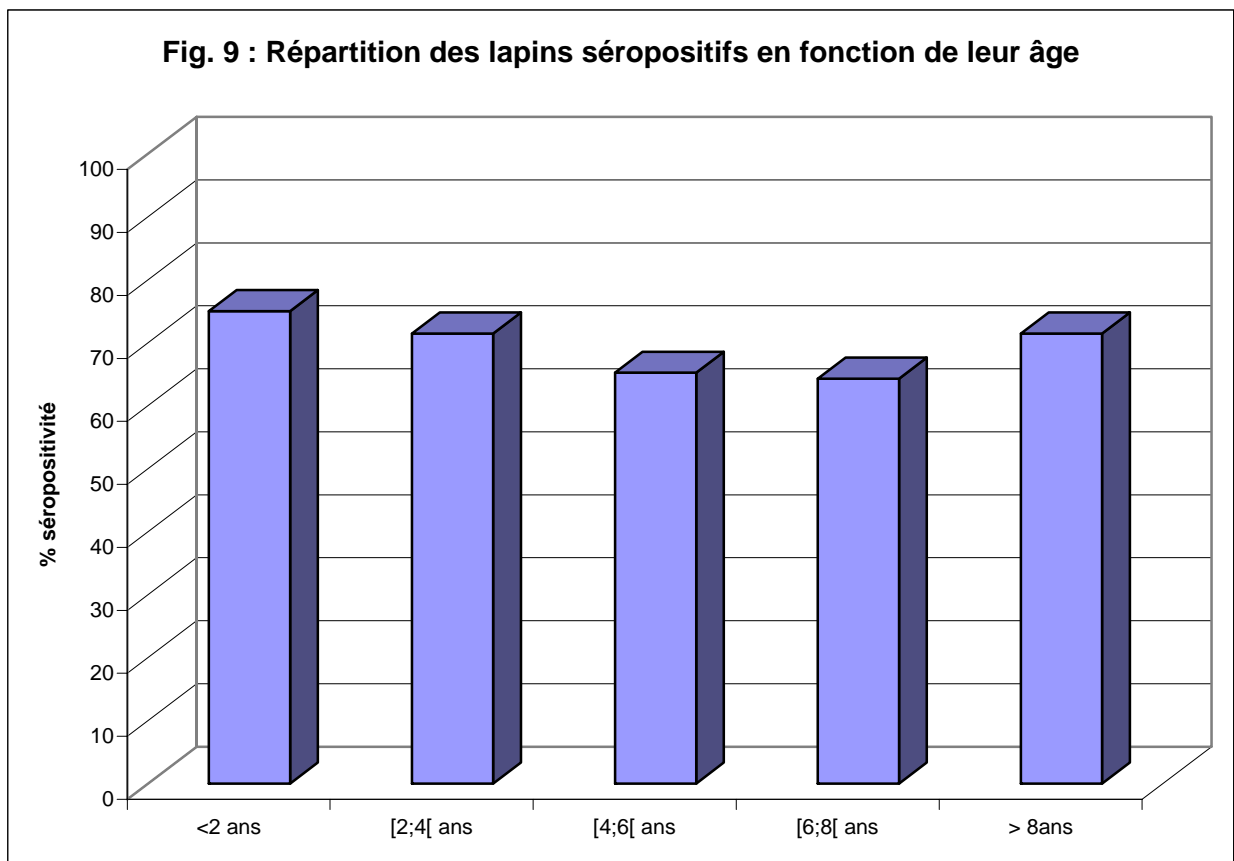
La valeur du  $\chi^2$  étant de 1,46, la différence n'est pas significative au seuil de 5% et peut donc être imputée aux fluctuations d'échantillonnage.

**La séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi* n'est pas significativement différente chez le mâle et chez la femelle.**

### **3.1.4 Répartition par âge**

Parmi les 103 lapins dont l'âge est connu (omission dans le remplissage de la fiche de renseignements), la répartition se fait comme suit (Figure 9) :

- 24 lapins ont moins de 2 ans dont 18 (75%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 28 lapins ont entre 2 et 4 ans dont 20 (71%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 23 lapins ont entre 4 et 6 ans dont 15 (65%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 14 lapins ont entre 6 et 8 ans dont 9 (64%) répondent positivement à l'immunofluorescence,
- 14 lapins ont plus de 8 ans dont 10 (71%) répondent positivement à l'immunofluorescence.



Chaque lot est comparé à tous les autres lapins. Lorsque le test du  $\chi^2$  n'est pas applicable car plusieurs valeurs sont inférieures à 5, la loi exacte de Fisher est appliquée. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5 : Résultats des tests statistiques pour la répartition  
des lapins en fonction de leur âge**

| Lot       | Test utilisé | Résultats       | Interprétation               |
|-----------|--------------|-----------------|------------------------------|
| < 2 ans   | $\chi^2$     | $\chi^2 = 0,39$ | Différence non significative |
| [2;4[ ans | $\chi^2$     | $\chi^2 = 0,04$ | Différence non significative |
| [4;6[ ans | $\chi^2$     | $\chi^2 = 0,31$ | Différence non significative |
| [6;8[ ans | $\chi^2$     | $\chi^2 = 0,24$ | Différence non significative |
| > 8 ans   | Fisher       | p = 1           | Différence non significative |

Les différences entre les lots ne sont pas significatives au seuil de 5% et peuvent donc être imputées aux fluctuations d'échantillonnage.

**Quel que soit l'âge du lapin, la séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi* n'est pas significativement différente.**

### **3.2 Comparaison des différents tests**

#### **3.2.1 Comparaison Immunofluorescence / Dot-Blot sur protéines totales**

Parmi les 103 lapins ayant subi ce test, 47 (46%) ont répondu positivement, 36 (35%) négativement et 20 (19%) n'ont pu être interprétés car douteux.

Si on compare les résultats aux deux tests, on obtient la répartition suivante :

|                                   |          | Immunofluorescence |          |
|-----------------------------------|----------|--------------------|----------|
|                                   |          | Positifs           | Négatifs |
| Dot-Blot sur<br>protéines totales | Positifs | VP = 46            | FP = 1   |
|                                   | Négatifs | FN = 8             | VN = 28  |

D'où le calcul des différents critères de ce nouveau test :

- ✓ La sensibilité **Se = 85 %**
- ✓ La spécificité **Sp = 97 %**
- ✓ La valeur prédictive positive **VPP = 98 %**

- ✓ La valeur prédictive négative **VPN = 78 %**

### 3.2.2 Comparaison Immunofluorescence / Dot-Blot sur protéines purifiées

Parmi les 124 lapins ayant subi ce test, 73 (59%) ont répondu positivement, 35 (28%) négativement et 16 (13%) n'ont pu être interprétés car douteux.

Si on compare les résultats aux deux tests, on obtient la répartition suivante :

|                                  |          | Immunofluorescence |          |
|----------------------------------|----------|--------------------|----------|
|                                  |          | Positifs           | Négatifs |
| Dot-Blot sur protéines purifiées | Positifs | VP = 71            | FP = 2   |
|                                  | Négatifs | FN = 0             | VN = 35  |

D'où le calcul des différents critères de ce nouveau test :

- ✓ La sensibilité **Se = 100 %**
- ✓ La spécificité **Sp = 95 %**
- ✓ La valeur prédictive positive **VPP = 97 %**
- ✓ La valeur prédictive négative **VPN = 100 %**



## **4 Discussion**

### **4.1 Protocole**

Il est important de se demander si le protocole permet de répondre aux objectifs fixés initialement.

#### **4.1.1 Nature des prélèvements**

Seul le sang a été prélevé, puisque l'objectif était d'établir une séroprévalence. Cependant, un prélèvement d'urine aurait été intéressant pour mettre directement en évidence la présence des spores d'*Encephalitozoon cuniculi* et corréler infection et séropositivité. Ce prélèvement n'était pas réalisable de façon pratique en clientèle. De plus, comme l'excrétion des parasites n'est pas continue et comme les anticorps persistent dans l'organisme après l'infection, seule la présence de spores aurait pu confirmer l'infection. Enfin, la nature des prélèvements dépendait du type d'analyse qui allait être effectué. Cf 4.1.2 Choix des analyses.

#### **4.1.2 Choix des analyses**

Peu de laboratoires s'intéressent à l'encéphalitozoonose, encore moins à celle du lapin de compagnie. Dans un cadre de recherche, le laboratoire de Parasitologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand a répondu à ma requête. Le choix des analyses dépend donc de la disponibilité dans ce laboratoire.

#### **4.1.3 Choix des animaux**

Le choix de prélever tous les animaux présentés à la consultation des Docteurs QUINTON et BULLIOT avait pour objectif de ne pas introduire de biais dans l'échantillonnage. Cependant, tous les lapins amenés à la consultation n'ont pas été prélevés (omissions), en particulier quand ceux-ci ne présentent pas de signes cliniques évocateurs d'encéphalitozoonose. Une surestimation de la prévalence est donc possible. De plus, les lapins sains sont moins présentés en consultation que les animaux malades, la population étudiée est donc la population des lapins de compagnie médicalisés. Enfin, il a fallu s'adapter à la clientèle

puisque certains propriétaires ont refusé le prélèvement, provoquant ainsi un autre biais dans l'échantillonnage.

En faisant une estimation indirecte de la représentativité de l'échantillon par l'étude d'une variable démographique, le sexe, on remarque une proportion plus importante des mâles (35 femelles contre 70 mâles). Or il devrait y avoir autant de mâles que de femelles (proportion théorique qui est effectivement observée au sein de la totalité de la clientèle du Docteur QUINTON). Si on compare notre échantillon avec la population totale par le test du  $\chi^2$ , l'indice (5,72) est supérieur à la valeur fournie dans les tables. On ne peut donc pas affirmer que l'échantillon est représentatif de la population de lapins de compagnie médicalisés en Ile-de-France. Nous n'avons aucune explication à fournir à ce résultat.

Les prélèvements ont été effectués uniquement en région parisienne. Il serait intéressant d'élargir l'étude au reste de la France.

#### **4.1.4 Nombre de prélèvements**

Les lapins ont été prélevés par des vétérinaires exerçant essentiellement voir exclusivement avec les NAC, ce qui a permis d'obtenir rapidement un nombre relativement élevé d'échantillons.

Nous n'avons pas déterminé de taille d'échantillon en nous basant, comme nous l'aurions dû sur une prévalence attendue. En effet, comme aucune étude n'était disponible en France avant la notre, nous aurions pu nous baser sur une étude étrangère, mais nous avons prélevé le maximum de lapins pendant la période disponible. Nous prenions un risque de ne pas atteindre, faute de cette estimation, une valeur de précision relative suffisante. Comme la prévalence est de 69% et la précision absolue de 9%, la précision relative observée est de 13%, ce qui est une valeur tout à fait satisfaisante pour une étude de prévalence.

#### **4.1.5 Recueil des commémoratifs**

Chaque fiche de commémoratifs permettait de recueillir des informations d'ordre général (âge, sexe, motif de consultation) et des informations concernant plus particulièrement l'encéphalitozoonose (déclinaison des symptômes évocateurs). Elle a également été établie de sorte à simplifier le travail du vétérinaire qui n'avait qu'à entourer les symptômes présents. Le but était de récolter le maximum d'information nécessaire pour l'interprétation des résultats, en particulier vérifier si la séropositivité est plus souvent associée à un (ou des) signe(s)

clinique(s) particulier(s). Cependant, certaines fiches de commémoratifs étaient incomplètes. Quelques prélèvements n'ont ainsi pas pu être intégrés à certains lots et le nombre moins élevé de lapins dans un lot a induit une perte de précision. Nous avons cependant considéré qu'il n'y avait pas d'influence majeure sur l'exactitude du résultat car ces omissions sont ponctuelles et involontaires.

#### **4.1.6 Répartition en lots**

Afin de préciser l'intérêt et la fiabilité de la sérologie dans le diagnostic de la maladie et de vérifier si la séropositivité est plus souvent associée à un (ou des) signe(s) clinique(s) particulier(s), à un (ou des) facteur(s) prédisposant(s), les animaux sont successivement répartis en différents lots. Chaque répartition avait un but précis comme cela a été décrit précédemment.

## **4.2 Résultats**

### **4.2.1 Séroprévalence pour *Encephalitozoon cuniculi***

Dans notre étude, la séroprévalence chez le lapin de compagnie pour le parasite *Encephalitozoon cuniculi* est de 69 % +/- 9%. Mais cette séroprévalence n'est pas significativement différente pour chacun des lots, quels que soient la clinique, le sexe ou l'âge de l'animal. Cette étude semble en accord avec les enquêtes réalisées en Allemagne par EWINGMANN et GÖBEL [14], et en Angleterre, deux études dirigées par HARCOURT-BROWN [22, 23], où entre 45 et 66% des lapins de compagnie tout venant sont séropositifs. Cependant, l'étude de HARCOURT-BROWN de 2004 [22] mettait en évidence une légère prédisposition des mâles. L'étude récente dirigée par KEEBLE et SHAW (2006) [25 bis] montre également qu'aucun facteur (âge, sexe, élevage, poids, litière, nourriture, contacts avec d'autres animaux, vaccination) n'est statistiquement associé à la séropositivité.

Ces études semblent donc montrer que les lapins sont porteurs ou non d'anticorps anti-*Encephalitozoon cuniculi* indépendamment de ces facteurs et que cela ne prédispose en rien au déclenchement de symptômes évocateurs ou non d'encéphalitozoonose. Cette maladie s'exprime-t-elle vraiment chez le lapin de compagnie ? Les animaux, qui proviennent essentiellement d'animaleries, sont-ils contaminés lorsqu'ils sont en lot ? leurs anticorps persistent-ils plusieurs années ou les lapins se réinfestent-ils par leurs propres urines ? Ces

questions méritent d'être posées et une recherche plus poussée sur des animaux à la symptomatologie fortement évocatrice doit être entreprise. Des dilutions des sérums permettant de connaître le taux d'anticorps et la mise en évidence directe (dans les urines par exemple) des parasites sont également à envisager.

## **4.2.2 Comparaison des différents tests**

### **4.2.2.1 Choix de l'antigène**

Etant donné l'absence de relation validée entre le résultat de l'immunofluorescence et l'infection et étant donné que l'immunofluorescence indirecte, technique couramment utilisée, nous a été imposée par le laboratoire partenaire, nous avons dû choisir cette technique comme test de référence pour évaluer les deux nouveaux tests (Dot-Blot sur protéines totales et sur protéines purifiées). Cependant, des réactions antigéniques croisées peuvent se produire et la corrélation n'est sûrement pas totale. De plus, la séropositivité des lapins testés ne peut être certaine avec les tests sérologiques disponibles actuellement (immunofluorescence indirecte, ELISA, immunoélectrophorèse, réaction à l'encre de Chine, test d'agglutination indirecte) car tous se basent sur l'utilisation du parasite entier comme antigène. L'utilisation de l'immunofluorescence indirecte comme test de référence n'est donc ni meilleur ni moins bonne que les autres techniques sérologiques, mais ce n'est sûrement pas un test idéal. D'où l'intérêt d'utiliser des antigènes spécifiques d'*Encephalitozoon cuniculi* comme les protéines de l'exospore ou du tubule polaire pour éviter les réactions croisées. Mais, comme il a été évoqué précédemment, la corrélation maladie clinique / séropositivité n'est pas établie. L'intérêt de la sérologie semble donc très limité pour le diagnostic de l'encéphalitozoonose chez le lapin de compagnie.

### **4.2.2.2 Intérêt pratique en clientèle**

L'immunofluorescence et les autres techniques sérologiques actuelles ne sont pas réalisables en clientèle. Elles nécessitent trop de temps et de matériel. Le Dot-Blot quant à lui pourrait être développé sous la forme d'un test rapide comme il en existe déjà en médecine vétérinaire, pour connaître le statut FeLV/FIV des chats par exemple. Les bandelettes sur lesquelles seraient déposés les trois protéines serviraient de base et le clinicien n'aurait plus qu'à déposer le sérum puis le révélateur. Cependant, le développement d'un tel test semble compromis pour l'instant car la demande est très faible et l'intérêt incertain.

### 4.2.2.3 Critères de validité des Dot-Blot

La sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative des DOT-BLOT sont bonnes (avec les protéines totales) voire excellentes (Se et VPN = 100% avec les protéines purifiées) par rapport à l'immunofluorescence. Il y a donc une très forte corrélation entre l'immunofluorescence et le Dot-Blot sur protéines totales, corrélation encore meilleure avec le DOT-BLOT sur protéines purifiées.

On note cependant 8 « faux négatifs » en Dot-Blot sur protéines totales. On pourrait alors supposer que des réactions croisées se sont produites en immunofluorescence et que ces lapins sont en fait infestés par une autre espèce du genre *Encephalitozoon*. Mais en Dot-Blot sur protéines purifiées, ces « faux négatifs » disparaissent et on note la présence de 2 « faux positifs ». Une autre hypothèse est alors possible. En effet, en Dot-Blot sur protéines totales et en immunofluorescence indirecte, on utilise une « soupe » d'antigènes, c'est-à-dire de nombreux antigènes différents. On peut donc supposer que le nombre absolu d'antigènes d'intérêt est inférieur (par rapport au Dot-Blot sur protéines purifiées) ou que l'accès aux antigènes peut être compromis par d'autres protéines contenues dans le mélange.

L'association et surtout la répétition de l'immunofluorescence indirecte et/ou du Dot-Blot sur protéines purifiées permettent de confirmer la séropositivité en palliant aux avantages et aux inconvénients de chacune des techniques. En effet, l'immunofluorescence est une technique difficilement réalisable en clientèle et peut également révéler la présence d'anticorps dirigés contre d'autres espèces du genre *Encephalitozoon* (réaction croisée). Le Dot-Blot sur protéines purifiées pourrait être utilisé de façon pratique en clientèle, pourrait éviter certaines réactions croisées, propose un meilleur accès aux antigènes d'intérêt qui sont proportionnellement en plus grande quantité. Mais le principal problème du Dot-Blot est la forte proportion de résultats douteux et non interprétables (19% sur protéines totales, 13% sur protéines purifiées). Des améliorations pourraient être proposées. Pour limiter cette forte proportion de résultats douteux, c'est-à-dire de lapins répondant positivement à la GST, la séquence GST pourrait être remplacée par une séquence moins immunogène pour le lapin.



## Conclusion

L'encéphalitozoonose du lapin induit essentiellement des symptômes nerveux (torticolis, ataxie, parésie...), rénaux (signes d'insuffisance rénale, polyuro-polydypsie...) et oculaires (cataracte, hypopyon et surtout uvéite phacoclastique). Son traitement (extrapolé des thérapies entreprises chez l'homme) repose sur l'élimination des parasites (albendazole, fenbendazole 20mg/kg) et la diminution de l'inflammation réactionnelle (dexaméthasone 0,2mg/kg puis relais par des anti-inflammatoires non stéroïdiens).

Pour cette première étude menée en France, 69% +/- 9% des lapins médicalisés de Région Parisienne se révèlent porteurs d'anticorps dirigés contre *Encephalitozoon cuniculi*. Même si une surestimation de la prévalence est probable, cette étude témoigne de l'importance du taux d'infestation. Cependant, aucune relation entre séropositivité et encéphalitozoonose clinique n'a pu être mise en évidence. De même, ni l'âge ni le sexe ne semble prédisposer à cette séropositivité. Cette étude est en accord avec celles déjà publiées par EWRINGMANN et GÖBEL en 1999 [14], HARCOURT-BROWN en 2003 et 2004 [22, 23] et par KEEBLE et SHAW en 2006 [25 bis], mais aucune ne peut conclure sur le ou les facteurs déclenchant l'encéphalitozoonose. La sérologie ne permettant pas de progresser dans l'étude de cette maladie, les recherches doivent être réorientées en particulier en essayant de mettre directement le parasite en évidence.

La comparaison des deux tests sérologiques a révélé que le Dot-Blot de protéines spécifiques d'*Encephalitozoon cuniculi* est d'une valeur tout à fait comparable à l'immunofluorescence. Le risque de réaction croisée est moindre et la réalisation pratique est plus simple, mais près de 1/5 des résultats ne sont pas interprétables. Aucun test sérologique n'est parfaitement fiable, d'où l'intérêt de répéter et de combiner les différents tests.





## Bibliographie

- [1]- ADAM KMG, PAU J, ZAMAN V. Nosematosis. *In : Medical and veterinary protozoology*. Edinburgh and London 1971, 58-59.
- [2]- BANEUX PJR, POGNAN F. *In utero* transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory Animals*, 2003, **37** (2), 132-138.
- [3]- BOOT R, HANSEN AK, HANSEN CK, NOZARI N, THUIS HCW. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals*, 2000, **34** (3), 281-289.
- [4]- CHALUPSKY J, VAVRA J, GAUDIN JC, VANDEWALLE P, ARTHUR CP, GUENEZAN M, LAUNAY H. Mise en évidence sérologique de la présence d'encéphalitozoonose et de toxoplasmose chez le lapin de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) en France. *Bulletin de la société Française de Parasitologie*, 1990, **8** (1), 91-95.
- [5]- CHERMETTE R, HAFFAR H. Maladies parasitaires du lapin de compagnie et des rongeurs domestiques. *Bulletin des GTV*, 1991, **91** (1), FIV-062.
- [6]- CONKOVA E, CELLAROVA E, NEUSCHL J, HALANOVA M, BALANT P et SUTIAK V. The dynamics of creatinine and urea concentrations in the blood serum of rabbits infected by *Encephalitozoon cuniculi* microsporidium and treated with albendazole. *Acta Veterinaria Beograd*, 1999, **49** (5-6), 321-326.
- [7]- COUDERT P. "L'*Encephalitozoon cuniculi*" : un opportuniste à surveiller. *Cuniculture-Paris*, 2001, **158**, 69-70.
- [8]- DEPLAZES P, PATHIS A, BAUMGARTNER R *et al.* Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clinical Infectious Diseases*, mars 1996, **22** (3), 557-559.

[9]- DEVERRIERE M. *Microsporidies communes à l'homme et aux animaux : étude bibliographique*. Thèse Méd. Vét., Toulouse, 2003, n°56.

[10]- DIDIER ES, DIDIER JD, SNOWDEN KF, SHADDUCK JA. Microsporidies in mammals. *Microbes and Infection*, 2000, **2**, 709-720.

[11]- DIDIER ES, ROGERS LB, BRUSH AD *et al.* Diagnosis of disseminated microsporidian *Encephalitozoon hellem* infection by PCR-Southern analysis and successful treatment with albendazole and flumagillin. *J Clin Microbiol*, 1996, **34** (4), 947-952.

[12]- EROKSUZ Y, EROKSUZ H, OZER H, CEVIK A, UNVER O. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elazig, Turkey : pathomorphologic and serologic (carboimmunoassay test) studies. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 1999, **54** (3), 73-77.

[13]- EUZEBY J. *Protozoologie médicale comparé Vol. II*. Lyon 1987. Collection fondation Marcel Merieux. 60-71.

[14]- EWRINGMANN A, GÖBEL T. Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Encephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. (Etude de la clinique et du traitement de l'Encéphalitozoonose chez le lapin de compagnie) *Kleintierpraxis*, 1999, **44**, 357-372.

[15]- FEAGA WP. Wry neck in rabbits. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1997, **210** (4), 480.

[16]- FUDGE AM. Laboratory medicin, avian and exotic pets. W.B. Sanders Compagny, 2000, p355, 358-362.

[17]- FUENTEALBA IC, MAHONEY NT, SHADDUCK JA *et al.* Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administrated per rectum. *Veterinary Pathology*, 1992, **29**, 536-540.

[18]- FURUYA K, FUKUI D, YAMAGUCHI M, NAKAOKA Y, BANDO G, KOSUGE M. Isolation of *Encephalitozoon cuniculi* using primary tissue culture techniques from a

rabbit in a colony showing encephalitozoonosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2001, **63** (2), 203-206.

[19]- GENTZ EJ, CARPENTER JW. Neurologic and Musculoskeletal Disease. In : HILLYER EV, QUESENBERRY KE. *Ferrets, Rabbits and Rodents, clinical medicine and surgery*. Philadelphia 1997, 220-226.

[20]- GEVREY J. Encéphalitozoonose des carnivores domestiques. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 1993, **169** (5-6), 477-481.

[21]- GREENSTEIN G, DROZDOWICZ CK, GARCIA FG, LEWIS LL. The incidence of *Encephalitozoon cuniculi* in a commercial barrier-maintained rabbit breeding colony. *Laboratory Animals*, 1991, **25** (4), 287-290.

[22]- HARCOURT-BROWN FM. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2004, **13** (2), 86-93.

[23]- HARCOURT-BROWN FM, HOLLOWAY HKR. *Encephalitozoon cuniculi* in pets rabbits. *Veterinary Record*, 2003, **152** (14), 427-431.

[24]- KATINKA MD, DUPRAT S, CORNILLOT E, METENIER G, THOMARAT F, PRENSIER G, BARBE V, PEYRETAILLADE E, BROTTIER P, WINCKER P, DELBAC F, EL ALAOU H, PEYRET P, SAURIN W, GOUY M, WEISSENBACH J, VIVARES CP. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 22 Nov. 2001, **414**(6862), 450-453.

[25]- KEEBLE EJ. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Veterinary Record*, 2002, **151** (22), 680.

[25 bis]- KEEBLE EJ, SHAW DJ. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 2006, **158**, 539-544.

[26]- KHAN IA, MORETTO M, WEISS LM. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes and Infection*, 2001, **3**, 401-405.

[27]- KIRSCHNER SE. Ophthalmologic diseases in small mammals. In : HILLYER EV, QUESENBERRY KE. *Ferets, Rabbits and Rodents, clinical medicine and surgery*. Philadelphia 1997, 341-342.

[28]- KRAFT V, BLANCHET HM, BOOT R *et al.* Recommendations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. *Laboratory Animals*, 1994, **28**, 1-12.

[29]- KUNSTYR I, NAUMANN S. Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and encephalitozoonosis. *Laboratory Animals*, 1985, **19**, 208-213.

[30]- LARSON JIR. Identification of microsporidia. *Acta Protozool.*, 1999, **38**, 161-197.

[31]- LEVADITI C, NICOLAU S, SCHOEN R. L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 1923, **89**, 985-988.

[32]- LEVINE ND. Microspora and myxozoa. In : *Veterinary protozoology*. 1st ed Iowa State University Press Amer. 1985, 329-333.

[33]- MARCATO PS. Les affections nerveuses du lapin. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 1990, **166** (2), 477-481.

[34]- MO L, DRANCOURT M. Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Nov. 2004, **11** (6), 1060-1063.

[35]- NAST R, MIDDLETON DM, WHELER CL. Generalised encephalitozoonosis in a Jersey wooly rabbit. *Canadian Veterinary Journal*, mai 1996, **37** (5), 303-305.

[36]- NEUSCHL J, CONKOVA E, KROKAVEC P, CELLAROVA E, HALANOVA M, HIPIKOVA V, BALENT P and SUTIAK V. The development of encephalitozoonosis in

rabbits after infection by *Encephalitozoon cuniculi* and treatment with albendazole. *Acta Veterinaria Beograd*, 1999, **49** (5-6), 327-334.

[37]- RINDER H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop Med int Health*, 1996, **1**, 373-378.

[38]- SNOWDEN KF, DIDIER ES, ORENSTEIN JM, SHADDUCK JA. Animal model of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*, déc 1998, **48** (6), 589-592.

[39]- SNOWDEN K, LOGAN K, DIDIER ES. *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *Journal of Infectious Diseases*, déc 1999, **180** (6), 2086-2088.

[40]- STILES J, DIDIER E, RITCHIE B, GREENACRE C, WILLIS M, MARTIN C. *Encephalitozoon cuniculi* in the lens of a rabbit with phacoplastic uveitis : confirmation and treatment. *Veterinary and Comparative Ophthalmology*, 1997, **7** (4), 233-238.

[41]- SUTER C, MÜLLER-DOBLIES UU, HATT, JM, DEPLAZES P. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Veterinary Record*, 2001, **148** (15), 478-480.

[42]- THOMAS C, FINN M, TWIGG L, DEPLAZES P, THOMPSON RCA. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Australian veterinary Journal*, 1997, **75** (11), 808-810.

[43]- THOMARAT F, VIVARES CP, GOUY M. Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J Mol Evol*. 2004, **59**, 780-791.

[43 bis]- TOMA *et al.* *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. 2<sup>ème</sup> édition Paris : AEEMA, 2001, 696p.

[44]- VANASSE-SAINT-JACQUES C. Encéphalite granulomateuse du lapin reliée à *Encephalitozoon cuniculi*. *Méd. Vét. Québec*, 1984, **14** (1), 29-32.

[45]- VAN GOOL T, SNUDERS F, REISS P *et al.* Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidia infections in patients with HIV by a new fluorescence technique. *J Clin Pathol*, 1993, **46**, 694-699.

[46]- WASSON K, PEPPER RL. Mammalian microsporidiosis. *Veterinary Pathology*, 2000, **37**, 113-128.

[46 bis]-WAWRZYNIAK I. Communications personnelles.

[47]- WEBER R, BRYAN RT, OVEN R *et al.* Improved light microsporidial detection of microsporidia spore in stool and duodenal aspirate. *New Eng J Med*, 1992, **326**, 161-166.

[48]- WESONGA HO, MUNDA M. Rabbit encephalitozoonosis in Kenya. *Laboratory Animals*, 1992, **26** (3), 219-221.

[49]- WOLFER J, GRAHN B, WILCOCK B, PERCY D. Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology*, 1993, **3**, 92-97.

[50]- WRIGHT JH, CRAIGHEAD EM. Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med*, 1922, **36**, 135-140.

## **Séroprévalence d'*Encephalitozoon cuniculi* chez le lapin de compagnie en Région Parisienne**

NOM : BEAURIN

Prénom : Dorothée

RESUME :

*Encephalitozoon cuniculi* est une microsporidie responsable de troubles nerveux, rénaux et oculaires chez le lapin mais également chez d'autres mammifères dont l'homme. Afin de préciser l'importance de l'encéphalitozoonose et le (ou les) éventuel(s) facteur(s) prédisposant chez le lapin de compagnie, une étude épidémiologique a été entreprise. D'octobre 2005 à mai 2006, 124 lapins de compagnie vivant en Région Parisienne ont subi un prélèvement sanguin et les anticorps anti-*E. cuniculi* ont été mis en évidence par immunofluorescence. Les sérums ont également été soumis à des Dot-Blot sur protéines spécifiques d'*E. cuniculi* afin de comparer les différents tests. 69% des lapins se sont révélés séropositifs sans qu'aucun facteur, tant au niveau de la clinique que de l'âge ou du sexe, ne soit statistiquement associé à la séropositivité. L'intérêt de la sérologie dans le diagnostic de l'encéphalitozoonose est donc limité et d'autres expériences sont nécessaires pour comprendre l'épidémiologie de cette maladie.

Mots-Clés : SEROPREVALENCE, *Encephalitozoon cuniculi*, ENCEPHALITOZOONOSE, MICROSPORIDIE, LAPIN, REGION PARISIENNE.

JURY :

Président Pr.....

Directeur Pr Jacques GUILLOT

Assesseur Dr Nadia HADDAD HOANG XUAN

Adresse de l'auteur :

Melle Dorothée BEAURIN

1, rue A. BENARD

59430 FORT-MARDYCK

## **Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits from Ile-de-France**

SURNAME : BEAURIN

Given name : Dorothée

SUMMARY :

*Encephalitozoon cuniculi* is a microsporidian species responsible for nervous, renal and ocular diseases in rabbits but also in other mammals including humans. In order to assess the importance and possible predisposing factors for encephalitozoonosis, an epidemiological survey was performed. From October 2005 to May 2006, blood samples were collected from 124 pet rabbits living in the region Ile-de-France. Specific anti-*E. cuniculi* antibodies were detected by immunofluorescence. A specific protein Dot-Blot test was also performed and the results of the two serological tests were compared. The presence of specific antibodies was detected in 69% of the rabbits. There was no difference according to the clinical signs, the age or the sex. As a consequence, the interest of serology for the diagnosis of encephalitozoonosis is limited and other experiments are required to better understand the epidemiology of this parasitic infection.

Key words : SEROPREVALENCE, *Encephalitozoon cuniculi*, ENCEPHALITOOZONOSIS, MICROSPORIDIA, RABBIT, ILE-DE-FRANCE.

JURY :

President      Pr.....  
Director      Pr Jacques GUILLOT  
Assessor      Dr Nadia HADDAD HOANG XUAN

Author's adress :

Mss Dorothée BEAURIN  
1, rue A. BENARD  
59430 FORT-MARDYCK