

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2024 - 2025

N° 73

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par
Arthur WILHELM

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 16 OCTOBRE 2024

**Profil épidémiologique et potentiel zoonotique des microsporidies
chez les grands singes africains au travers de l'étude
microMONKEY et dans la démarche du concept « One Health »**

JURY

Président : Pr. Denys BRAND, doyen de l'UFR des sciences pharmaceutiques de Tours

Directeur : Pr. Guillaume DESOUBEUX, PU-PH Parasitologie-Mycologie, CHU de Tours

Membres : Dr. Adélaïde CHESNAY, MCU-PH Parasitologie-Mycologie, CHU de Tours

Dr. Antoine LECLERC, vétérinaire à la clinique du ZooParc de Beauval, St-Aignan-sur-Cher

ANNEE : 2024 - 2025

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAudeau, Mme Claire POUPLARD, Mme Audrey OUDIN, Mme GERMON Stéphanie

ENSEIGNANTS

16 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAJE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAudeau	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE
THIBault	Gilles	IMMUNOLOGIE

33 MAITRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE & TOXICOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
DELAJE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE

DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE
JUSTE	Matthieu	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
LAJOIE	Laurie	IMMUNOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
UDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SAHLI	Ramla	PHARMACOGNOSIE
SIEROCKI	Pierre	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 MAST

CAMUS GABRIEL	Mathilde	<i>Filière Officine</i>
---------------	----------	-------------------------

5 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE
POUPIN	Pierre	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
VEYRAT DUREBEX	Charlotte	BIOCHIMIE CLINIQUE

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

BOULARD	Pierre	IMMUNOLOGIE
DOUEZ	Emmanuel	PHARMACIE GALENIQUE
TULOUP	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

GERBIER	Soledad	ANGLAIS
---------	---------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

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

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

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 16 octobre 2024

L'étudiant
Arthur WILHELM

Le Doyen de la Faculté
Professeur Denys BRAND

REMERCIEMENTS

À Monsieur Denys Brand, que je remercie pour m'avoir fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse et pour l'intérêt porté à mon travail.

À Monsieur Guillaume Desoubaux, pour la confiance que vous m'avez accordée. Je vous remercie pour votre accueil, votre sympathie et votre enseignement lors de mon stage et pendant la rédaction de cette thèse.

À Madame Adélaïde Chesnay, merci pour tout ce que tu m'as appris, d'avoir répondu à mes questions incessantes et de m'avoir encore plus fait aimer cette discipline.

À Monsieur Antoine Leclerc, que je remercie pour avoir accepté de faire partie de ce travail en tant que membre du jury et en m'ayant fait découvrir l'envers du décor du ZooParc de Beauval.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie qui m'a accueilli et qui m'a formé à la discipline dans une ambiance agréable et bienveillante.

À la confrérie ; Benjamin, Bruno et Hugo. Parce que vous êtes les meilleurs amis dont on peut rêver, et que je plains tous ceux qui n'ont pas ma chance, je voulais vous remercier pour tout. Je passe les meilleurs moments de ma vie avec vous, et c'est à chacune de nos retrouvailles que je suis le plus heureux du monde. Je sais que vous me soutiendrez toujours, que vous me protégerez contre le monde entier, et que je pourrai toujours compter sur vous. Pour les personnes que vous êtes, pour notre amitié précieuse et sans condition, merci.

À Luc, mon frère de cœur. Merci d'avoir été là pour ces journées de travail dans la douleur et l'ennui, mais surtout pour ce temps passé à picoler, à rire aux larmes et à rêver du futur. Vivement qu'on continue à affronter le monde ensemble et à passer de longues soirées à se remémorer tout ça, une bière à la main.

À Gaël et Maÿlis, je vous remercie du fond du cœur pour les amis que vous êtes. On a passé beaucoup de moments à souffrir ensemble, et j'attends votre tour pour qu'on puisse dire que c'est enfin terminé. J'espère que le pôle Nord ne vous changera pas trop, que vous resterez ces amis exceptionnels et le soutien irremplaçable que vous représentez pour moi.

À Émilie, merci d'être venue me parler ce soir-là, sur la place Saint-Pierre, sans quoi je n'aurais jamais eu une amie aussi géniale. Merci pour tes conseils si précieux, ton empathie inégalable et toutes les soirées inoubliables que j'ai passées avec toi.

À Nicolas, mon super copain. On aura fait un internat exemplaire, une colocation formidable, affronté des situations catastrophiques et partagé les meilleures balades nocturnes. J'ai hâte de continuer nos aventures incroyables et d'inventer avec toi de nouveaux délires toujours plus stupides les uns que les autres.

À Laura, ma BBF. Je n'oublierai pas tout ce qu'on a cassé, tous ces fous rires et notre complicité. J'attends impatiemment nos prochaines histoires désastreuses et j'espère qu'on continuera à en rire ensemble pendant longtemps.

À mes co-internes et amies, grâce à qui les journées loin de mon Sud-Ouest ont été si agréables. Clem, merci pour ta présence, ton humour génial, ton soutien incessant et pour ces innombrables pauses café mémorables. Merci à Jul d'avoir toujours été là pour discuter, me faire rire et pour m'avoir partagé les potins les plus croustillants. Merci à Carlitita, pour ses conseils avisés et ces danses improvisées dans les couloirs et les laboratoires. Merci également à mes amis Capu, Dr. S, Vivi, et à tous ceux avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant mon internat.

À Hermès, mon premier ami.

À Hayah, pour sa fidélité sans relâche et sa présence lorsqu'il fallait courir le matin, jouer la journée et réviser le soir.

À Elsa, ma cousine et meilleure amie. Je te remercie pour les passions que tu m'as transmises, et pour tous ces moments de bonheur passés ensemble.

Aux membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu ; Merci Tatie Chantal, Tatie Josie, Tonton Michel, Tatie Martine et Tonton Michel, que j'aime tant. Pour votre soutien et tout l'amour que vous m'avez donné depuis le début, vous serez toujours comme pères et mères pour moi.

À mon petit frère Vincent, qui compte énormément pour moi, et qui me manque beaucoup trop. Nos disputes, nos passions communes et notre soutien mutuel ont créé la relation unique et géniale que je partage avec toi. Ta gentillesse, ton courage et ton intégrité m'impressionneront toujours. Pour tout ça, et parce que je sais que nous serons toujours là l'un pour l'autre, je t'aime.

À mon papa et à ma maman que j'aime tant. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour tout l'amour que vous m'avez donné, tout ce que vous m'avez transmis, et pour tous les sacrifices. Avec tout ce qu'on a traversé ensemble, c'est à vous que je dois la personne que je suis aujourd'hui, et j'espère vous rendre fiers. Vous serez toujours mes modèles. Je vous aime.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	7
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
RESUME	11
ABSTRACT	12
INTRODUCTION	13
LE CONCEPT « ONE HEALTH »	13
LES MALADIES ZOONOTIQUES EMERGENTES.....	16
LES MICROSPORIDIES	19
LA MICROSPORIDIOSE COMME MALADIE EMERGENTE	19
TAXONOMIE ET PHYLOGENIE	21
GENOTYPAGE.....	23
<i>Principe et intérêt</i>	23
<i>Le séquençage Sanger</i>	24
<i>Le séquençage de nouvelle génération</i>	27
<i>Génotypage de l'espèce Enterocytozoon bienewisi</i>	28
MORPHOLOGIE	31
<i>Morphologie générale des microsporidies</i>	31
<i>Caractéristiques morphologiques d'Enterocytozoon bienewisi</i>	33
<i>Caractéristiques morphologiques d'Encephalitozoon intestinalis</i>	33
CYCLE DE VIE	34
ENVIRONNEMENT.....	37
LES PRIMATES ET LA MICROSPORIDIOSE	39
LA MICROSPORIDIOSE CHEZ L'HOMME	39
<i>Épidémiologie</i>	39
<i>Pathogénicité</i>	40
<i>Diagnostic</i>	42
<i>Prise en charge thérapeutique</i>	43
LA MICROSPORIDIOSE CHEZ LES PRIMATES NON HUMAINS	44
<i>Pathogénicité chez les singes saïmiri</i>	44
<i>Pathogénicité chez les macaques</i>	45

<i>Pathogénicité chez les grands singes non-humains</i>	46
FOCUS SUR L'ETUDE MICROMONKEY	47
CONTEXTE	47
OBJECTIFS	48
MATERIELS & METHODES	49
<i>Populations simiennes étudiées</i>	49
<i>Réserves africaines et centres zoologiques participants</i>	51
<i>Collecte et conservation des échantillons</i>	51
<i>PCR quantitative</i>	52
<i>Génotypage</i>	54
<i>Analyse du microbiote fécal</i>	55
CONCLUSION	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
ANNEXE 1 – ESPECES DES MICROSPORIDIOSES HUMAINES	64
ANNEXE 2 – PROTOCOLE DETAILLE DE L'EXTRACTION ADN	65
ANNEXE 3 – PROTOCOLE DETAILLE DE L'AMPLIFICATION ADN	67

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1. Organisations internationales à l'origine du concept One Health.</i>	14
<i>Figure 2. Enjeux et principes du concept One Health.</i>	16
<i>Figure 3. Principales causes de décès dans le monde en 2019.</i>	18
<i>Figure 4. Phylum Microspora au sein du règne Fungi.</i>	22
<i>Figure 5. Représentation de la région ITS.</i>	24
<i>Figure 6. Étapes successives du séquençage Sanger.</i>	26
<i>Figure 7. Séquençage de nouvelle génération (NGS) ou dit "à haut débit".</i>	27
<i>Figure 8. Arbre génotypique d'Enterocytozoon bieneusi.</i>	29
<i>Figure 9. Représentation d'une spore de microsporidie.</i>	31
<i>Figure 10. Photographies des spores d'Encephalitozoon intestinalis (A) et Enterocytozoon bieneusi (B).</i>	34
<i>Figure 11. Infestation in vitro d'une cellule rénale de singe par une spore d'Encephalitozoon intestinalis, par externalisation du tube polaire de la spore vers la cellule cible.</i>	35
<i>Figure 12. Cycle de vie intracellulaire des microsporidies.</i>	36
<i>Figure 13. Répartition des microsporidies dans l'environnement et chez les animaux.</i>	37
<i>Figure 14. Genres des microsporidies retrouvées dans l'environnement et chez les animaux.</i>	38
<i>Figure 15. Agents responsables de microsporidioses en France entre 2018 et 2021.</i>	39
<i>Figure 16. Causes d'immunodépression de patients atteints de microsporidiose.</i>	41
<i>Figure 17. Représentation graphique des espèces de la super-famille des Hominoidea.</i>	49
<i>Figure 18. Répartition géographique des grands singes en Afrique et en Asie du Sud-Est.</i>	50
<i>Figure 19. Parcs zoologiques et réserves africaines participant à l'étude microMONKEY.</i>	51

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Espèces responsables de microsporidioses chez l'Homme.</i>	64
--	----

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) : Centre pour le contrôle et la prévention des maladies

CHU : Centre hospitalo-universitaire

CNR : Centre national de référence

COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) : maladie à coronavirus 2019

FAO (*Food and Agriculture Foundation*) : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

ITS (*Internal transcribed spacer*) : Espaceur interne transcrit

LSU (*Long subunit*) : Grande sous-unité du ribosome

MLG (*multilocus genotype*) : Génotypage multilocus

MLST (*multilocus sequence typing*) : Typage génétique par séquençage multilocus

NGS (*New generation sequencing*) : Séquençage de nouvelle génération

NHP (*Nonhuman primates*) : Primates non humains

NTP : Nucléotide triphosphate

OMS : Organisation mondiale de la santé

OMSA : Organisation mondiale de la santé animale

PCR (*Polymerase chain reaction*) : Polymérase par réactions en chaîne

PTPs (*Polar tube proteins*) : Protéines du tube polaire

SARS (*Severe acute respiratory syndrome*) : Syndrome respiratoire aigu sévère

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SIV : Virus de l'immunodéficience simienne

SSU (*Small subunit*) : Petite sous-unité du ribosome

ST (*sequence type*) : type de séquence

UNICEF (*United Nations Children's Fund*) : Fond des nations unies pour l'enfance

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

RESUME

Les microsporidies sont des eucaryotes parasites intracellulaires obligatoires et opportunistes, responsables de symptomatologies digestives, dans la plupart des cas chez le patient immunodéprimé. Retrouvées dans l'environnement sous forme de spores infestantes, il existe une multitude d'espèces différentes, dont quatorze sont des pathogènes de l'Homme. Bien qu'*Enterocytozoon bieneusi* et le genre *Encephalitozoon* soient le plus souvent incriminés en pathologie humaine, ils sont également très répandus dans l'environnement et chez les animaux à travers le globe. Insectes, oiseaux, poissons, rongeurs et autres mammifères présentent un portage de microsporidies non négligeable, même en l'absence de symptômes. Pouvant être ainsi transmises par contact direct ou indirect avec des animaux infestés, les microsporidies sont liées à une transmission zoonotique et interindividuelle. La proximité grandissante des animaux avec l'Homme, par le biais de l'élevage intensif, de la déforestation, de l'urbanisation croissante et des déplacements individuels et commerciaux, est un facteur de risque établi qui ne cesse de s'accroître avec la mondialisation. Les grands singes africains retrouvés dans des réserves naturelles, à l'état sauvage ou dans des parcs zoologiques européens, sont de plus en plus confrontés à l'activité humaine. Ce rapprochement géographique exprime donc un risque de transmission des microsporidies pour les individus en contact avec eux. Afin d'étudier cet aspect épidémiologique de la microsporidiose, l'étude microMONKEY évalue la prévalence du portage des microsporidies chez certaines populations de grands singes en Afrique et dans des zoos européens. Déterminer la prévalence d'*Enterocytozoon bieneusi* et d'*Encephalitozoon intestinalis* chez ces mammifères par PCR quantitative et identifier les souches communes par génotypage MLST des régions ITS, de microsatellites et de minisatellites de l'ADN permettrait d'établir un profil épidémiologique de la répartition de ces pathogènes au sein de populations simiennes bien précises. Par la suite, l'étude de leurs microbiotes intestinaux et la comparaison à d'autres souches retrouvées chez l'Homme permettrait de savoir s'il existe une corrélation et une transmission inter-espèces des microsporidies.

ABSTRACT

Microsporidia are obligate and opportunistic intracellular parasitic eukaryotes responsible for digestive symptoms, mostly in immunocompromised patients. Found in the environment as infectious spores, there is a multitude of different species, fourteen of which are pathogenic to humans. Although *Enterocytozoon bieneusi* and the *Encephalitozoon* genus are most often implicated in human pathology, they are also widespread in the environment and in animals across the globe. Insects, birds, fish, rodents, and other mammals carry microsporidia in significant quantities, even in the absence of symptoms. Potentially transmitted through direct or indirect contact with infected animals, microsporidia are associated with zoonotic and interindividual transmission. The growing proximity of animals to humans through intensive farming, deforestation, urbanization, and individual and commercial travel is an established risk factor that continues to increase with globalization. African great apes found in nature reserves, in the wild, or in European zoological parks are increasingly exposed to human activity. This geographical closeness, therefore, poses a transmission risk of microsporidia for individuals in contact with them. To study this epidemiological aspect of microsporidiosis, the microMONKEY study evaluates the prevalence of microsporidia carriage in certain great ape populations in Africa and European zoos. Determining the prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in these mammals and by quantitative PCR and identifying common strains through MLST genotyping of the ITS regions, microsatellites, and minisatellites of DNA would help establish an epidemiological profile of the distribution of these pathogens in specific simian populations. Subsequently, studying their intestinal microbiota and comparing them with other strains found in humans would allow us to determine if there is a correlation and interspecies transmission of microsporidia.

INTRODUCTION

LE CONCEPT « ONE HEALTH »

La mondialisation et l'ensemble des activités humaines ne cessent de s'accroître depuis le milieu du XX^e siècle et continuent de transformer le monde en profondeur. La multiplication des liens politiques, économiques, sociaux et culturels tout autour du globe entraîne des changements majeurs à l'échelle planétaire. Une transformation significative des comportements humains à travers les voyages individuels, les mouvements migratoires, les échanges commerciaux croissants ou encore le dérèglement climatique sont des facteurs qui exposent l'humanité à de nouveaux problèmes de grande ampleur (1). Parmi eux, l'émergence de nouveaux défis en matière de santé publique est particulièrement notable.

Les maladies infectieuses se propagent plus facilement, plus rapidement et de plus en plus loin par la multiplication des déplacements humains : les flux migratoires importants, le tourisme ou encore le transport de marchandises font que les menaces pour la santé installées à un endroit le sont également pour la santé dans le monde entier (2–4). Le dérèglement climatique apporte des moustiques vecteurs d'organismes pathogènes sous de nouvelles latitudes et étend leurs périodes d'activités (5). Des bactéries et des champignons développent de plus en plus de résistances aux traitements en raison d'une exposition massive et prolongée aux pesticides utilisés dans les secteurs de l'agriculture et de l'élevage, qui sont en pleine intensification (6). La pollution, l'utilisation de perturbateurs endocriniens ou les changements de modes d'alimentation sont tout autant de facteurs qui impactent l'état de santé des populations humaines (2,4).

Bien que la mondialisation puisse être la cause de nouvelles problématiques sanitaires, elle est également à l'origine d'une diffusion plus rapide de l'information et des avancées scientifiques, permettant ainsi de relever les défis présents et futurs de manière plus efficace que jamais, grâce à de nouvelles méthodes interdisciplinaires de portée internationale. La commercialisation et la distribution rapide de traitements novateurs, l'accessibilité simplifiée aux nouveaux vaccins ou le développement de nouvelles

techniques de diagnostic rapides et performantes sont des atouts majeurs dans la prise en charge des maladies infectieuses qui sévissent dans le monde, à différentes échelles.

Toutes ces problématiques, combinées à la recrudescence des pathologies émergentes et réurgentes qui menacent la santé humaine, imposent une gestion rigoureuse pour prévenir des crises épidémiques de grande envergure (4). À ce jour, nous savons que la santé de l'environnement, la santé animale et la santé humaine sont interconnectées et que les changements de l'une d'entre elle provoque un impact réel sur les autres. Il est donc nécessaire de mettre en place une méthode de travail spécifique afin de prévenir les dangers qui peuvent affecter l'ensemble de ces états de santé.

Le concept « One Health » (Une seule santé) voit officiellement le jour au début du XXI^e siècle lorsque le thème apparaît pour la première fois en 2003, initialement associé à l'émergence des maladies respiratoires aiguës sévères (SARS) (2). Il est soutenu par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) et l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), depuis sa création (Figure 1). Bien que ces trois organismes soient les fers de lance de ce mouvement, il existe une collaboration majeure avec beaucoup plus d'organisations internationales comme l'United Nations Children's Fund (UNICEF), divers ministères de santé nationaux ainsi que des organismes scientifiques spécialisés.



Figure 1. Organisations internationales à l'origine du concept One Health.

En réalité, ce concept n'est pas nouveau et ses premières mentions datent d'il y a presque deux cent ans : dans un premier temps en tant que « One Medicine » (Une seule médecine), puis « One World, One Health » (Une monde, une santé) pour enfin devenir « One Health » (Une seule santé) (7). Il se veut être une vision globale de la santé qui offre une vision holistique et qui a pour objectif principal de répondre à de nombreuses problématiques émergentes de santé publique (8).

Le Center for Disease Control and Prevention (CDC), basé à Atlanta, aux États-Unis, est un acteur majeur dans la prévention des risques sanitaires liés aux maladies infectieuses. Il définit « One Health » comme « une approche collaborative, multisectorielle et transdisciplinaire qui travaille aux niveaux local, régional, national et mondial pour atteindre des résultats de santé optimaux en reconnaissant l'interconnexion entre les personnes, les animaux, les plantes et leur environnement commun » (8).

Ainsi, l'OMS applique cette vision dans la résolution de plusieurs problématiques de santé. Parmi elles, on peut citer la résistance aux antimicrobiens et sa propagation chez des germes présents dans l'environnement, les maladies à transmissions vectorielles (dengue, virus du Nil occidental, paludisme...) ou encore la sécurité sanitaire des aliments (en prévention de pathologies telles que la listériose ou la salmonellose) (1). La gestion de l'ensemble des facteurs de risque agissant sur l'environnement, les animaux ou sur les êtres humains est primordiale, car tous ont des conséquences sur les autres santés (Figure 2).

Par le biais de ce nouveau concept, l'OMS souhaite briser les méthodes ancestrales afin de privilégier une approche générale et multiple des problématiques sanitaires en regroupant les professionnels de la santé humaine, animale et environnementale. Dans un objectif d'une action proactive et intégrée pour faire face aux maladies émergentes et anticiper les problématiques futures, elle met l'accent sur la surveillance et la promotion de ces systèmes de santé de manière interconnectée.

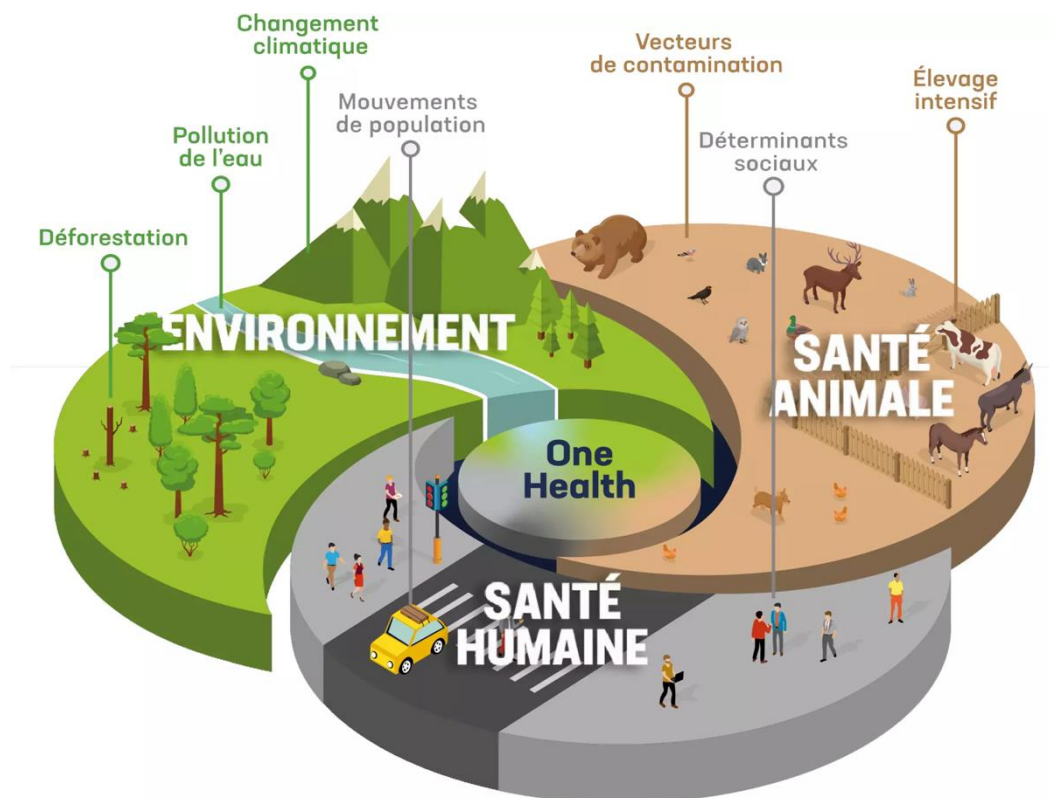


Figure 2. Enjeux et principes du concept *One Health*.
Source: Site de l'Espace Mendès France (EMF), Institut Balanités et l'Espace Mendès France.

La compréhension et la maîtrise d'un tel concept est nécessaire pour établir des plans et un contrôle des risques sanitaires majeurs concernant l'Homme, l'animal et l'environnement afin de trouver une réponse rapide et adaptée pour y faire face (4).

Bien qu'il existe un grand nombre de défis à relever et de menaces à éviter, les maladies infectieuses en font partie, et y occupent une place prépondérante. Parmi elles, les zoonoses retiennent particulièrement l'attention en raison de leur impact majeur et des moyens pouvant être mis en œuvre pour empêcher leur émergence.

LES MALADIES ZOONOTIQUES EMERGENTES

On ne compte pas moins de 1415 espèces pathogènes pour l'Homme, et 61 % d'entre elles présentent une origine animale : ce sont les maladies zoonotiques (9). Virus, bactéries, champignons, helminthes, protozoaires et autres parasites utilisent le lien étroit entre l'Homme et l'animal pour infecter et provoquer des maladies chez les individus, par contact indirect pour la majeure partie d'entre elles, ce qui concerne environ 60 % des

zoonoses (9–12). D'autres moyens de contamination sont souvent retrouvés, notamment le contact direct avec les animaux porteurs (35 %) ou l'intervention de vecteurs (22 %) tels que des tiques ou des insectes piqueurs-suceurs (9). Le potentiel zoonotique représente le risque de transmission de l'agent infectieux depuis l'animal vers l'Homme. Celui-ci dépend de nombreux facteurs : les caractéristiques de l'agent lui-même, son mode de contamination, son réservoir animal, la proximité entre son hôte et l'Homme...

En étudiant ces organismes de plus près, il a été constaté que la grande majorité d'entre eux présente l'animal comme réservoir (64 %). Ainsi, les deux tiers utilisent la faune sauvage, captive et domestique, pour être hébergés sans engendrer d'atteinte symptomatique, passant alors sous les radars et assurant leurs cycles de survie (9). Finalement, ces chiffres montrent que le caractère zoonotique d'une maladie infectieuse est un facteur de risque significatif quant au statut de maladie émergente.

Définie en 2006 par l'Office international des épizooties comme « infection nouvelle causée par l'évolution ou la modification d'un agent pathogène existant, par changement de son hôte, vecteur, de sa pathogénicité ou de sa souche », bon nombre de zoonoses entrent dans cette catégorie, justifiant l'accent mis sur le contrôle des zoonoses dans l'approche One Health. L'impact de ces maladies infectieuses est un véritable défi de santé publique, car au début du XXI^e siècle, les maladies infectieuses étaient responsables de 25 % des causes de décès chaque année dans le monde, soit 15 millions par an (13). En 2019, l'OMS dénombrait trois types de pathologies d'origine infectieuse parmi les dix plus mortelles – avec notamment les infections respiratoires, néonatales et digestives – sans prendre en compte les décès causés par les complications et les séquelles secondaires à des infections (Figure 3), malgré une nette diminution de ces pathologies depuis 2000 (14).

Leading causes of death globally

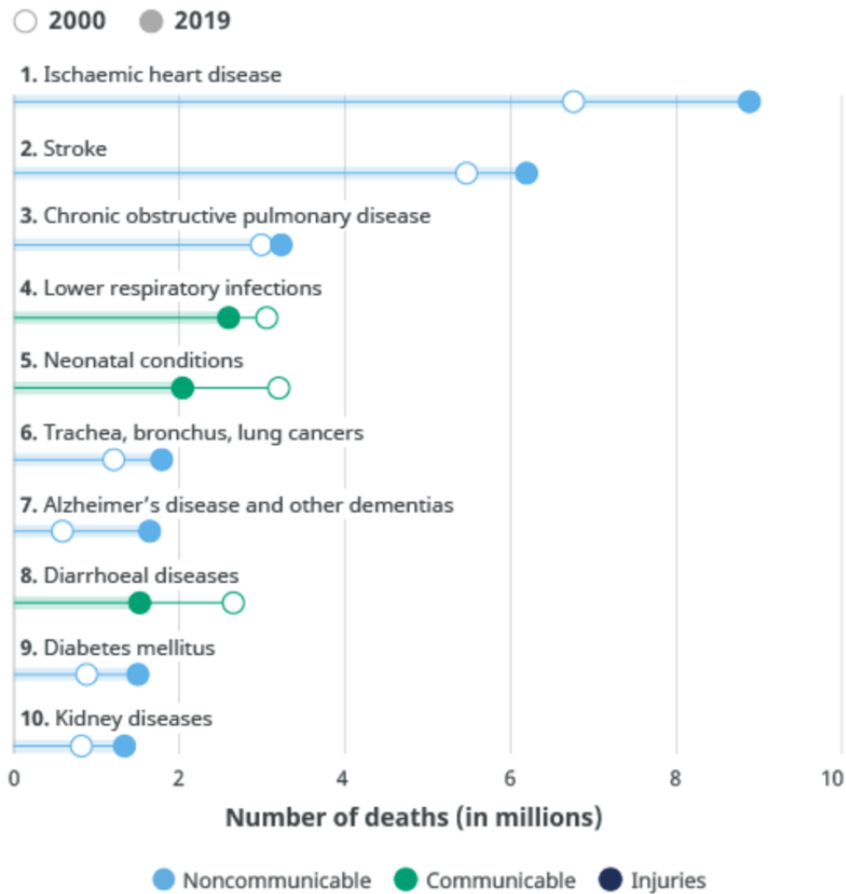


Figure 3. Principales causes de décès dans le monde en 2019.
Source : OMS. Estimations globales de la santé.

En 2019, la pandémie de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) provoquée par le virus SARS-CoV-2 a remis en perspective les moyens de lutte mis en œuvre contre l'apparition d'épidémies (15). Elle a été à l'origine de plus de 760 millions de cas avérés et près de sept millions de décès jusqu'à la date du 28 juin 2023 selon Santé Publique France (16). Ces chiffres appuient donc sur l'importance cruciale de la prévention des maladies infectieuses et de l'adoption d'une approche globale pour empêcher l'apparition de nouvelles épidémies telles que celle-ci.

Réparties de manière inégale autour du globe, les infections sont un problème de taille pour les organismes mondiaux et nationaux de santé publique, surtout dans les pays dits « à faibles revenus » où les moyens de prévention et de sécurité sanitaire sont les plus précaires, où six types d'infections font partie des dix causes les plus mortelles : les

infections néonatales, respiratoires, digestives, le paludisme, la tuberculose et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (14). Les populations précaires telles que les habitants vivant sous le seuil de pauvreté, les enfants en bas âge et les populations indigènes, sont les premières victimes des maladies infectieuses (12–14,17).

La gestion de l'émergence ou de la réémergence de maladies infectieuses nécessite une surveillance et une identification des nouvelles zoonoses dans la faune sauvage (18). Des modifications de l'environnement et de la vie animale entraînent des changements inévitables pour les microorganismes qui en dépendent et pouvant, par conséquent, provoquer l'apparition de nouvelles pathologies. Le concept One Health présente un intérêt capital dans la lutte contre ces maladies par l'anticipation de leur apparition et la surveillance de leur circulation. Dans cette optique, plusieurs études se sont penchées sur les moyens à mettre en œuvre et les points d'intérêt à contrôler. Plusieurs facteurs contribuant à l'émergence de pathologies infectieuses ont été soulevés : on y retrouve des facteurs génétiques, biologiques, politiques, économiques et sociaux interdépendants (17). Cette diversité factorielle renforce l'intérêt d'une méthode préventive sanitaire multidisciplinaire afin d'empêcher l'apparition de nouvelles pandémies.

LES MICROSPORIDIES

LA MICROSPORIDIOSE COMME MALADIE EMERGENTE

La première espèce de microsporidie connue fut officiellement découverte par Karl Wilhelm von Nageli en 1857, bien que d'anciens rapports de 1838, écrits par Gluge, évoquaient des microorganismes chez des poissons pouvant y ressembler, ou encore par Müller en 1841, ou Creplin en 1842. Nageli découvrit *Nosema bombycis*, une des espèces responsables de la « maladie européenne des vers à soie » : la pébrine (19). L'accumulation d'amas de spores sous la cuticule causait la mort des chenilles malades, ravageant l'industrie française et italienne de la soie, avant que Louis Pasteur n'étudie la question plus en profondeur pour trouver la solution au problème qu'il publia dans son ouvrage « Études sur les vers à soie » (19,20). Plusieurs décennies plus tard, d'autres

articles scientifiques évoquèrent des infections à microsporidies chez d'autres insectes, tels que les papillons ou les abeilles (21). Alors que la pathogénicité chez les insectes a ainsi été démontrée, il fallut attendre 1922 pour que les microsporidies soient décrites pour la première fois comme responsables d'une maladie chez les mammifères. Wright et Craighead étudièrent le cas d'un jeune lapin souffrant de paralysie motrice. Même si d'autres causes infectieuses ont été évoquées pour expliquer ces symptômes, c'est l'observation de spores d'*Encephalitozoon cuniculi* qui posa le tout premier diagnostic d'encéphalitozoonose chez un jeune lapin au statut immunitaire immature. Aujourd'hui, c'est une pathologie connue et répandue chez les léporidés. On estime que 30 à 97 % d'entre eux sont porteurs du parasite, même si tous ne développent pas de signes cliniques (19,20).

Les plus anciennes traces de microsporidioses humaines que l'on retrouve dans la littérature scientifique datent de 1985, lorsque plusieurs cas d'atteintes intestinales y ont été décrites (22,23). Ces rapports évoquaient des cas isolés, mais l'épidémie de VIH et l'augmentation de patients au stade du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) engendrèrent l'apparition de nombreux cas de microsporidiose, causées par des germes encore inconnus à cette époque (22).

Depuis ces premières publications, cette pathologie a été liée à plusieurs épidémies à travers le monde. Lors de l'été 1995, elle affecta 1 % des patients séropositifs au VIH en deux mois, dans la ville de Lyon (24). L'origine de cette épidémie n'a pas été clairement identifiée, même si le réseau d'eau reste encore le principal suspect. En 2009, c'est en Suède que 135 cas de microsporidioses intestinales ont été rapportés avec une source alimentaire commune (25). Plus récemment, c'est au centre hospitalo-universitaire de Tours, qu'en janvier 2018, trois cas de patients atteints de pathologies hématologiques malignes ont été victimes de microsporidiose due à *Enterocytozoon bienewisi* en l'espace de quatre jours, dans un service de soins. Cette incidence anormale a poussé les investigations jusqu'au séquençage des souches retrouvées. Les résultats obtenus ont démontré que ces souches pathogènes présentaient un génotype commun, mais dont l'origine de contamination demeure encore inconnue (26).

Bien qu'affectant cliniquement essentiellement des patients immunodéprimés, la microsporidiose est une pathologie ubiquitaire capable de provoquer des épidémies à plusieurs échelles, qu'elles soient communautaires ou potentiellement nosocomiales. L'origine des contaminations reste liée à l'environnement et concerne tout individu en contact avec les milieux où ces microorganismes vivent et sporulent.

La microsporidiose n'est pas considérée comme une zoonose à part entière, car elle affecte l'Homme autant que les animaux par contamination dans l'environnement. Cela étant, le potentiel de transmission inter-espèce reste un sujet à évoquer et à étudier car si les animaux peuvent être infectés par les microsporidies ou en être les porteurs, le contact direct ou indirect avec ces animaux peut constituer un risque de transmission non négligeable. Ainsi, une perception générale de l'environnement et du monde animal est primordiale pour étudier l'épidémiologie et les risques épidémiques liés à la transmission des microsporidies à l'Homme. C'est dans ce cadre précis que l'approche One Health prend tout son sens dans la connaissance et l'étude des microsporidioses.

TAXONOMIE ET PHYLOGENIE

La classification des microsporidies est sujette à de nombreux débats au sein de la communauté scientifique. Considérées comme des protozoaires pendant près d'un siècle, en raison de leur mode de vie parasitaire et de leurs caractéristiques morphologiques, c'est à partir de 1996, avec l'émergence des technologies de biologie moléculaire et la publication de différentes études phylogénétiques, que leur classification taxonomique a été révisée. En effet, grâce à de nouvelles techniques, plusieurs marqueurs génétiques utiles pour leur classification ont été découverts (27).

Aujourd'hui, les microsporidies constituent le phylum *Microspora* au sein du domaine *Eukarya* (eucaryotes) et du règne *Fungi* (champignons) qui regroupe des espèces dont les origines génétiques indiquent une divergence précoce au sein du règne (Figure 4) (28,29).

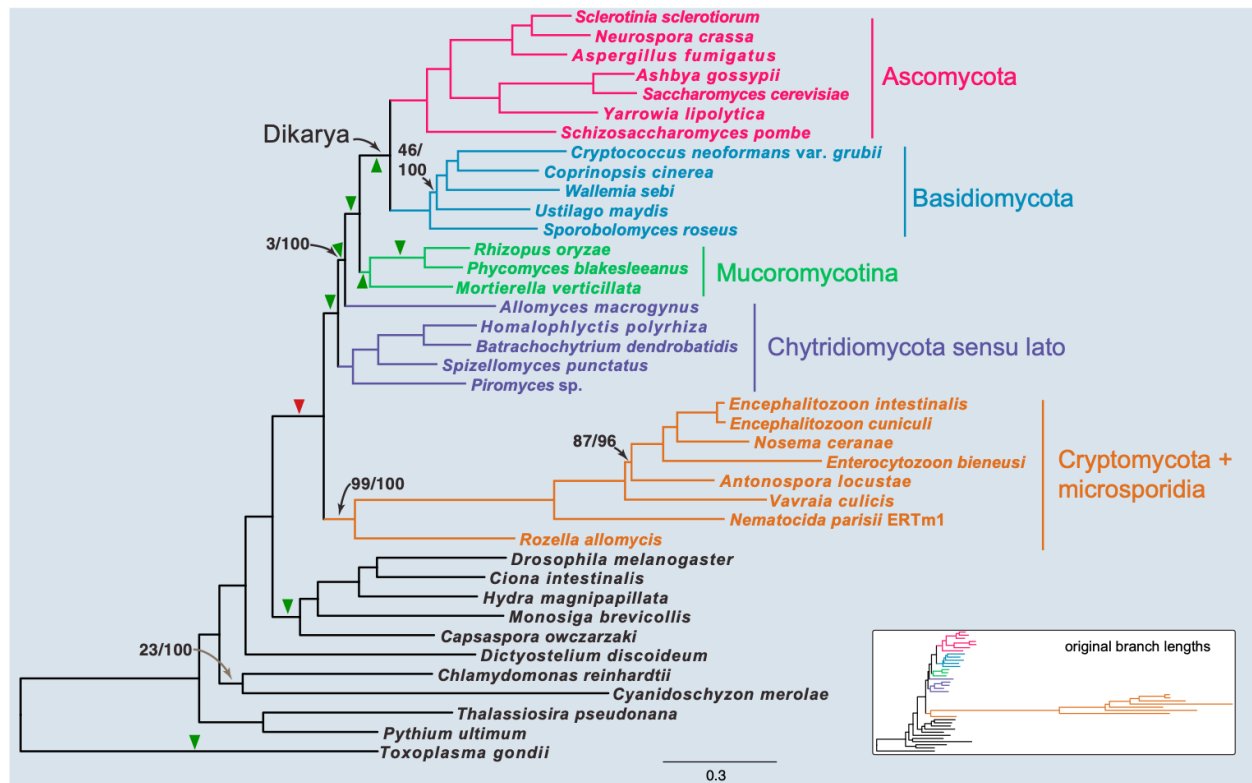


Figure 4. Phylum *Microspora* (en orange) au sein du règne *Fungi*.

Source : James TY, Pelin A, Bonen L, Ahrendt S, Sain D, Corradi N, Stajich JE. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and microsporidia. *Curr Biol*. 2013 Aug 19;23(16):1548-53.

Difficilement comparables aux autres eucaryotes, les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires qui possèdent plusieurs caractéristiques qui les rendent uniques en leur genre. Elles utilisent un mode d'infestation élaboré qui leur est propre, faisant intervenir une organelle particulière : le tube polaire. D'autre part, l'absence de mitochondries et la dépendance aux mitosomes (retrouvés chez certaines cellules eucaryotes) montrent une certaine simplicité de ces organismes en comparaison à d'autres eucaryotes et témoignent d'une nécessité des fonctions de la cellule hôte qui leur est vitale. Par ce biais, elles ont développé de nombreux mécanismes d'interaction spécifiques avec des cellules eucaryotes pour pouvoir les infester et ainsi subvenir à leurs besoins afin de survivre et proliférer (29).

Pendant le XX^e siècle, l'étude morphologique, comportementale et environnementale des microsporidies a permis de nommer, séparer et différencier des genres et des espèces au sein du phylum. Ainsi, l'étude de séquences génétiques, le type d'hôte et d'infection, la structure globale de la spore ou encore le mode de développement chez l'hôte sont

des paramètres qui ont fait la taxonomie des microsporidies telle qu'elle est, aujourd'hui (27). Ces dernières années, de nouvelles techniques comme la réaction en chaîne par polymérase (PCR) ou le séquençage génétique de pointe, ont permis d'étayer la classification des espèces. L'analyse génétique de l'acide ribonucléique (ARN) de la petite sous-unité ribosomale (SSUrRNA) a permis d'arriver jusqu'à dénombrer 1600 espèces de microsporidies, classées en plus de 200 genres et cinq clades : *Amblyosporida*, *Neopereziida*, *Nosematida*, *Enterocytozoonida* et *Glugeida* (27,29).

Alors que la taxonomie s'améliore et tend vers un modèle de référence qui se base sur plusieurs des paramètres cités plus haut, le cadre d'une classification claire et précise reste nécessaire afin de marquer la diversité génétique des microsporidies avec la plus grande précision possible. Étudier les génotypes et les catégoriser est indispensable pour évaluer et étudier la virulence des souches et des espèces, ainsi que leur impact sur la santé. Leur compréhension est nécessaire aux modèles épidémiologiques afin de travailler sur des perspectives d'émergence (27).

GENOTYPAGE

PRINCIPE ET INTERET

Dans cette optique, les microbiologistes se sont intéressés à une portion de l'ADN ribosomal (ADNr) que l'on retrouve chez les organismes eucaryotes : la région ITS (*Internal Transcribed Spacer* ou « Espaceur interne transcrit »). Pour être plus précis, il existe deux régions ITS principales que sont ITS1, entre les gènes 18S et 5.8S, et ITS2, quant à elle située entre les gènes 5.8S et 28S (30). Ces régions génétiques de l'ADN retrouvées chez tous les organismes eucaryotes sont non codantes et présentent un polymorphisme marqué. Ces caractéristiques font de la région ITS un atout en phylogénétique, du fait qu'elle est sujette à de nombreuses mutations dues au fort taux de délétions, d'insertions ou de mutations ponctuelles qu'elle subit (31). Elle sert à différencier et classer des espèces très proches par comparaison à d'autres séquences génétiques similaires, connues et conservées dans de larges banques génotypiques. N'importe quel exemple impliquant deux espèces avec des codes génétiques très ressemblants (certaines pouvant présenter une séquence identique à plus de 99 %) sur l'ADNr de la petite sous-unité du ribosome, montre qu'il est nécessaire un

approfondissement par séquençage de la région ITS pour les différencier avec plus de précision (27).

Le séquençage de l'ensemble de la région ITS utilise des amorces incluant ITS1, ITS2 et le fragment 5.8S qui les sépare. Pour le réaliser, plusieurs techniques ont été mises au point depuis les années 1970, dont les plus courantes sont le séquençage Sanger et le séquençage de nouvelle génération (NGS) (Figure 5).

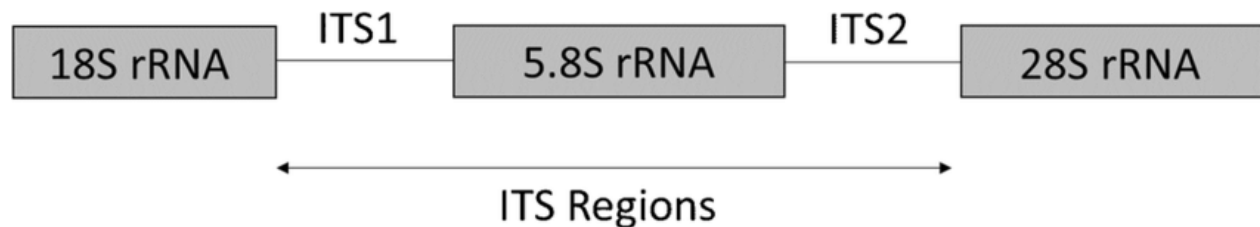


Figure 5. Représentation de la région ITS.

Source : Green BJ. Emerging Insights into the Occupational Mycobiome. Curr Allergy Asthma Rep. 2018 Sep 27;18(11):62.

LE SEQUENÇAGE SANGER

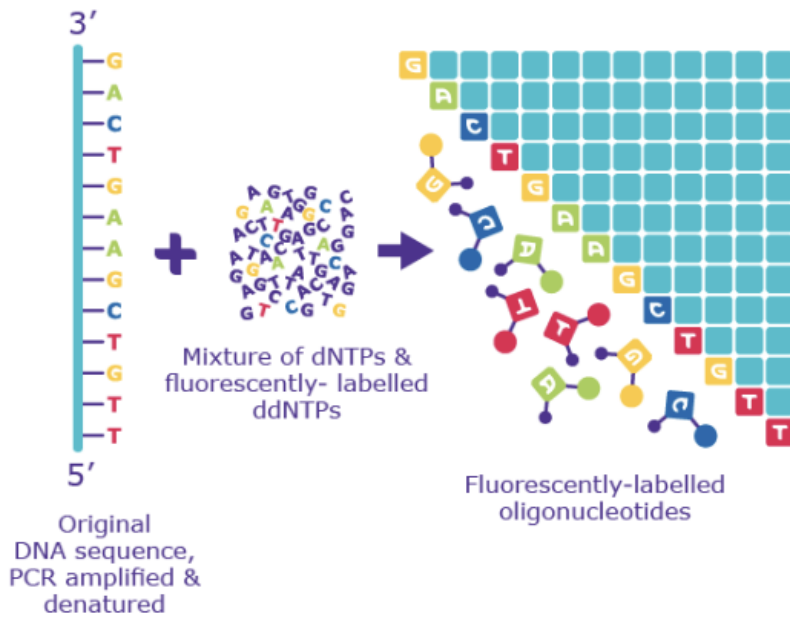
Le séquençage Sanger, ou séquençage par terminaison de chaîne, est une technique mise au point dans le but de déterminer la séquence des bases nucléotidiques d'un fragment d'ADN. Ce processus repose sur la synthèse d'un brin complémentaire à partir d'un brin d'ADN d'intérêt. La synthèse du brin complémentaire fait intervenir des amorces spécifiques, une ADN polymérase, des désoxyribonucléotides (dNTPs) pour l'élongation, ainsi que des didésoxyribonucléotides (ddNTPs), chacun associé à un fluorochrome spécifique pour chaque type de base (A, T, G, C).

Les amorces spécifiques s'hybrident au brin d'intérêt pour initier l'élongation par l'ADN polymérase, qui incorpore les dNTPs correspondants à la séquence complémentaire. La réaction se déroule dans un milieu contenant un excès de dNTPs et de ddNTPs, permettant à l'enzyme d'incorporer des ddNTPs dans la séquence, ce qui interrompt la synthèse du brin d'ADN en raison de l'absence d'un groupement 3' permettant l'ajout d'un autre dNTP. Ainsi, des millions de copies d'ADN sont amplifiées de cette manière, générant des fragments d'ADN de longueurs variées, chacun se terminant par un

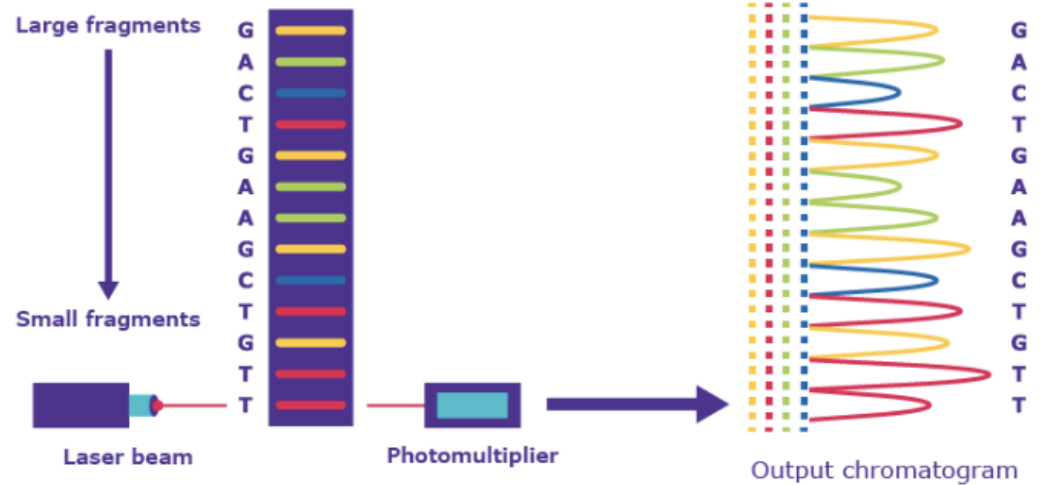
nucléotide marqué par un fluorochrome. Une détection par électrophorèse capillaire permet ensuite de séparer les brins en fonction de leur taille, et un laser détecte les signaux fluorescents des ddNTPs, terminateurs de chacun des brins. Un électrophorégramme associe chaque signal à une base correspondante, permettant ainsi de déterminer la séquence des brins complémentaires formés, et donc celle de la séquence d'intérêt (Figure 6).

Le séquençage Sanger est fiable, mais ses limites en termes de coût et de rapidité le rendent inadapté pour des séquençages à grande échelle. C'est notamment pour cette raison qu'il est surtout utilisé pour l'étude de petits fragments d'ADN.

1 PCR with fluorescent, chain-terminating ddNTPs



2 Size separation by capillary gel electrophoresis



3 Laser excitation & detection by sequencing machine

Figure 6. Étapes successives du séquençage Sanger.
Source : Sigma-Aldrich.

LE SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION

Le séquençage de nouvelle génération (NGS), dit « à haut débit », est une innovation technologique qui a pour objectif de séquencer rapidement et facilement de grandes portions comportant des millions de fragments d'ADN simultanément.

Le principe repose sur une fragmentation des brins de la séquence d'intérêt en de très nombreux morceaux de tailles très réduites pour lire toutes les séquences en parallèle. Une technique de polymérisation en chaîne (PCR) sert d'amplification afin de créer de nombreuses copies de chaque fragment à l'aide d'adaptateurs. Une fois ces fragments amplifiés, un séquençage par synthèse du brin complémentaire utilise des nucléotides fluorescents incorporés, détectés dans le brin d'ADN formé. Désormais séquencés, les fragments sont assemblés grâce à des algorithmes bioinformatiques pour reconstituer la séquence complète d'ADN (Figure 7).

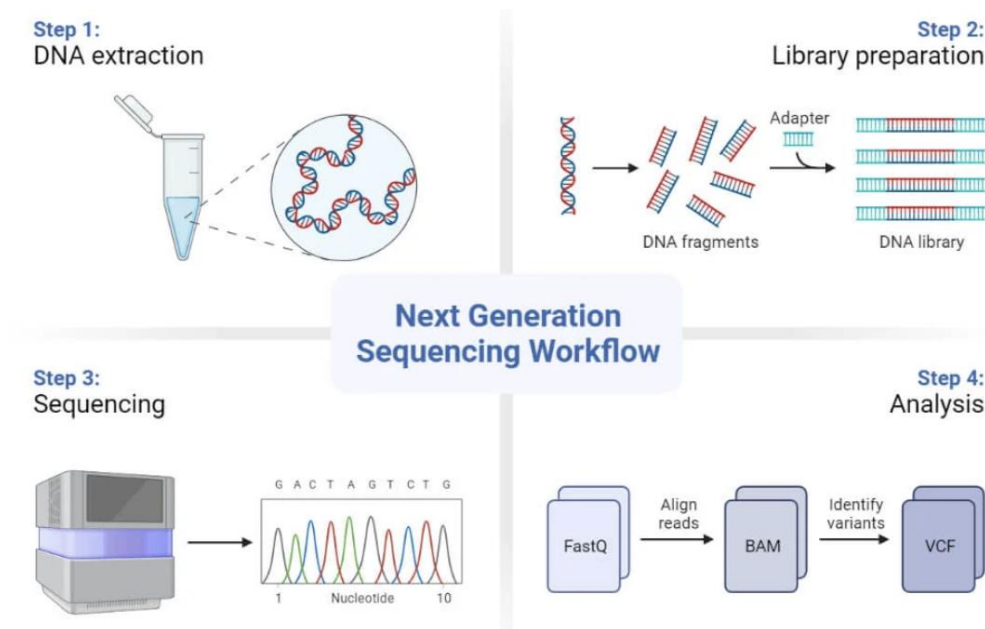


Figure 6. Séquençage de nouvelle génération (NGS) ou dit "à haut débit".
Source : Centre hospitalier universitaire vaudois, Laboratoire d'oncogénomique de Suisse.

La technique NGS est très utile pour le séquençage de génomes entiers et pour couvrir de larges portions d'ADN ou d'ARN. Particulièrement pratique pour l'étude de mutations cancéreuses, la recherche sur des maladies génétiques ou dans le développement de la médecine personnalisée, sa grande précision et sa portée étendue en font un choix tout notable pour des études phylogénétiques. Néanmoins, le séquençage NGS reste une méthode coûteuse qui nécessite une analyse et une gestion complexe pour être utilisée.

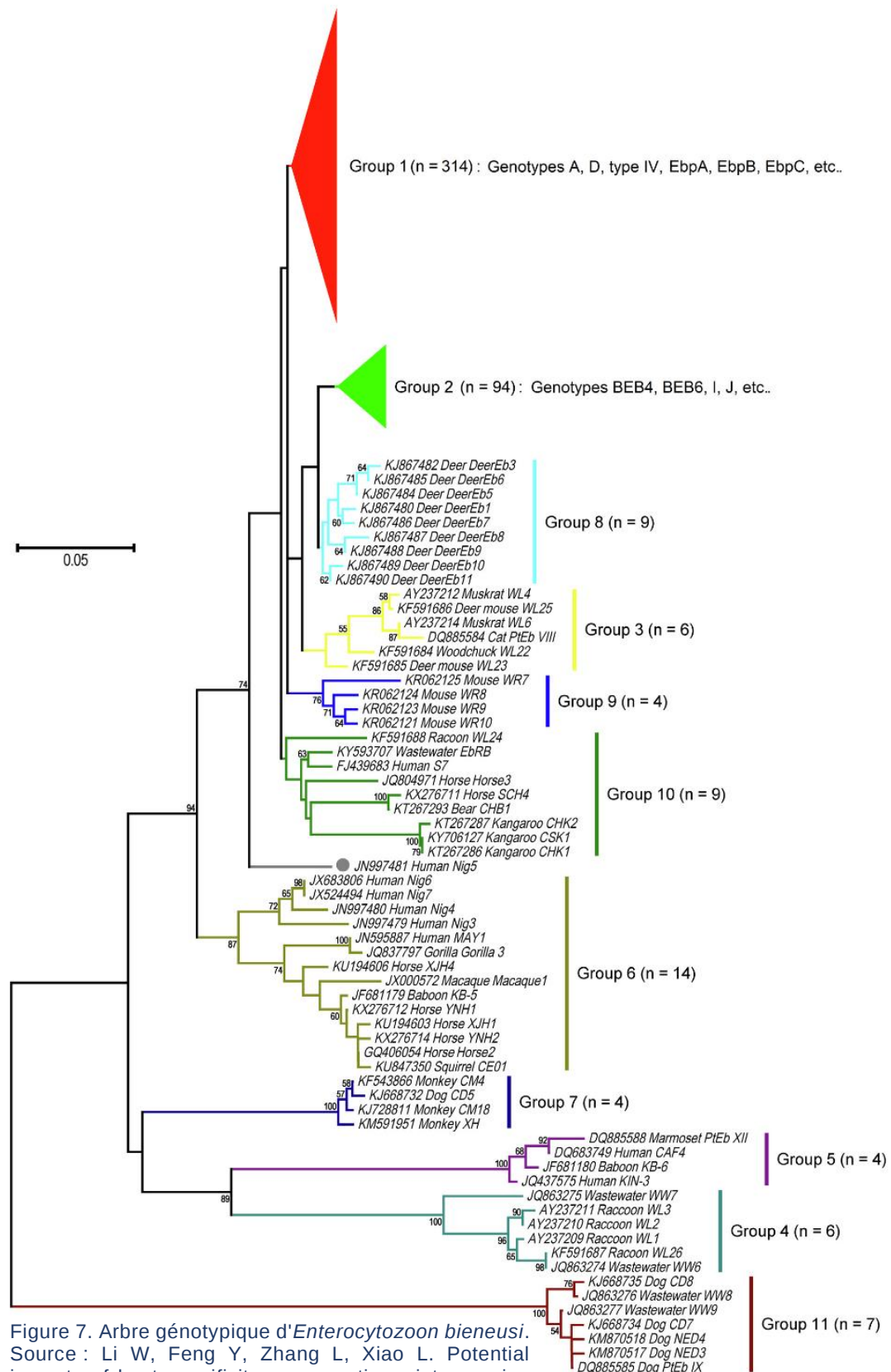
GENOTYPAGE DE L'ESPECE *ENTEROCYTOZOOM BIENEUSI*

Le génotypage de l'espèce *Enterocytozoon bieneusi* a longtemps été étudié en raison de la forte prévalence de cette espèce en médecine humaine. Basé sur le séquençage de la région ITS chez plusieurs souches d'*Enterocytozoon bieneusi* qui ont été isolées depuis différents hôtes, onze groupes génotypiques notés de 1 à 11 ont été identifiés et classés selon leurs similarités au sein de cette séquence nucléotidique (Figure 8) (32,33).

Le groupe 1 comprend 314 génotypes différents que l'on retrouve chez de nombreux hôtes tels que des animaux de compagnie et des animaux sauvages, chez des oiseaux ou encore chez l'Homme. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse d'une grande probabilité de transmission inter-espèces avec un potentiel zoonotique élevé. Le groupe 2 se compose de 94 génotypes et présente les mêmes caractéristiques d'hôtes et épidémiologiques que le premier. En revanche, les groupes 3 à 11 présentent des génotypes qui n'ont été isolés que chez des hôtes spécifiques (32,33).

Le séquençage de la région ITS est un atout majeur dans le génotypage des souches d'*Enterocytozoon bieneusi* (et par extension, des autres espèces de microsporidies ou d'organismes eucaryotes) mais il ne concerne qu'une faible proportion du génome total de l'espèce (environ 243 paires de bases) (32). Bien qu'il permette une différenciation génotypique globale, la petite taille de cette séquence rend son séquençage insuffisant pour déterminer des sous-groupes et ainsi présenter un historique du phylum et l'évolution phylogénétique au fil du temps.

D'autres marqueurs génétiques avec une forte variabilité et une grande résolution ont été recherchés pour gagner en précision dans le génotypage. Ainsi, les minisatellites et les microsatellites ont fait l'objet d'un intérêt particulier : ce sont des séquences répétées en tandem, présentant l'avantage d'être locus différents. Ainsi, la combinaison des séquençages de ces régions génétiques, associée à la région ITS permettent aujourd'hui un génotypage précis des différentes souches d'*Enterocytozoon bieneusi*. Le séquençage MLST s'intéresse aux *loci* ITS, MS1, MS3, MS4 et MS7 pour décrire des sous-populations classées SP1 à SP7 (32).



En recoupant les données obtenues, plusieurs tendances sont ressorties concernant les hôtes chez lesquels nous retrouvons certains génotypes et sous-populations. Les groupes 1 et 2 semblent avoir un potentiel zoonotique, celui du groupe 2 étant toutefois plus prononcé que celui du groupe, mais tous deux avec des spécificités d'hôte relativement faibles. En revanche, les groupes 3 à 11 fournissent peu d'informations sur leur potentiel zoonotique, mais présentent toutefois une forte spécificité d'hôte, chaque génotype n'étant retrouvé que chez un hôte unique (32).

En étudiant l'aspect épidémiologique des différents génotypes retrouvés chez l'Homme, les génotypes D, EbpC et type IV du groupe 1 sont les plus fréquemment responsables d'infections chez les hôtes dont ils sont isolés, qu'il s'agisse de l'Homme ou d'une autre espèce animale. Ces génotypes sont plus susceptibles de devenir des problèmes de santé publique de par leur fréquence, leur pathogénicité, leur risque zoonotique et par leur potentielle transmission entre différentes espèces (32).

Le groupe 2 infecte le plus souvent des ruminants, bien que certains génotypes tels que BEB4, BEB6, I ou encore J ne soient pas spécifiques d'un hôte en particulier (32). Enfin, les groupes 3 à 11 comportant des génotypes spécifiques d'hôtes, l'hypothèse d'un risque de santé publique les concernant reste beaucoup moins probable pour le moment (32). Dans de rares cas, des souches du groupe 5 ont été retrouvées chez l'Homme au Cameroun (34) ou des souches du groupe 7 chez des patients séropositifs pour le VIH au Nigeria (35).

Pour évoquer une autre espèce de microsporidie qu'*Enterocytozoon bienewisi*, le cas d'*Encephalitozoon intestinalis* est aussi intéressant. Dans ce cas-là, on utilise également la région ITS pour le génotypage, mais en y associant le séquençage des gènes codant pour les protéines du tube polaire (PTPs). Étant également un séquençage MLST de pointe, la classification des souches isolées dans l'environnement, chez l'Homme ou chez l'animal, reste très précise (36).

MORPHOLOGIE

MORPHOLOGIE GENERALE DES MICROSPORIDIES

La microsporidie est retrouvée dans l'environnement sous sa forme de résistance et infestante qu'est la spore (Figure 9). C'est une structure unicellulaire capable de résister à la dessiccation grâce à une paroi épaisse et quasi-imperméable, ce qui fait qu'on la retrouve fréquemment dans le sol, l'eau ou sur des aliments. Les formes et les tailles sont variables selon les espèces : elles peuvent être ovoïdes, rondes ou piriformes. Elles mesurent entre 1 et 4 μm pour la plupart, pouvant aller jusqu'à 10 μm pour les plus grandes (22,23,37).

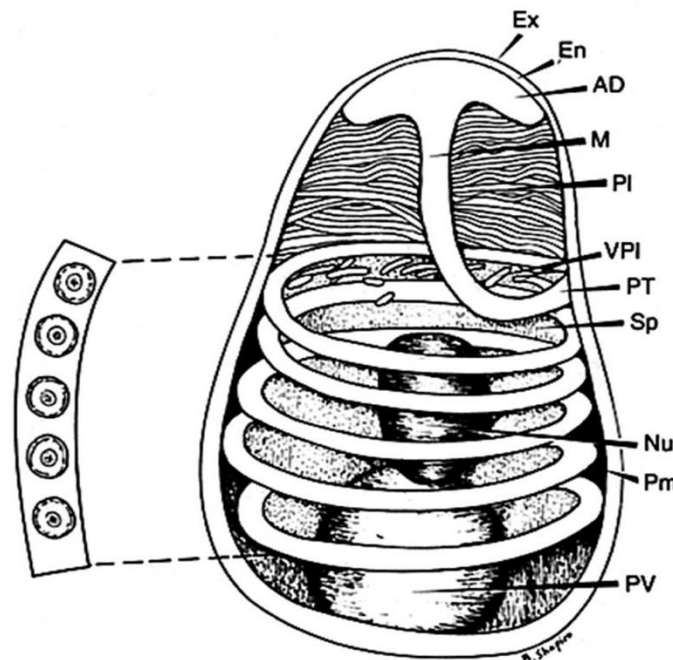


Figure 8. Représentation d'une spore de microsporidie. La paroi se divise en Exospore (Ex) et Endospore (En). Le tube polaire (PT) est relié au disque d'ancrage (AD) et se compose de 2 parties : le manubrioïde (M) et les vrilles. On retrouve le polaroplaste antérieur (PI) et le polaroplaste postérieur (VPI) autour du tube polaire. Le sporoplasme (Sp) contient un seul noyau (Nu), la vacuole postérieure (PV) et des ribosomes. Une membrane plasmique ou plasmalemm (Pm) peut être présente chez certaines espèces.

Source : Wittner M and Weiss LM. (Eds.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC: ASM Press. 1999

La paroi est composée de deux feuillets : l'exospore qui est en contact direct avec l'environnement, et l'endospore qui tapisse le versant interne de la paroi. Elles sont différenciables en microscopie électronique.

L'exospore joue un rôle prépondérant pour la survie de la spore dans l'environnement et vis-à-vis de ses interactions avec celui-ci. Elle est en contact avec le milieu extérieur et agit comme une coque protectrice qui empêche tout élément étranger d'entrer dans la structure. Sa forte densité, remarquable par une grande opacité en microscopie électronique, est le signe de son caractère quasi-imperméable. Elle est essentiellement composée de protéines impliquées dans sa fonction de barrière avec l'environnement, lui conférant la capacité de résister à des températures extrêmes (jusqu'à -80°C) et dans des conditions spécifiques (pH acide ou pH basique). Sa composition lui octroie une rigidité qui lui permet de conserver sa forme cellulaire, et qui lui offre des propriétés d'adhésion et de signalisation au cours d'interactions avec des stimuli extérieurs. Lors de la phase d'infestation cellulaire, la paroi interagit avec la cellule hôte ciblée (23).

L'endospore constitue la face interne de la paroi. Elle est transparente en microscopie électronique du fait qu'elle présente une faible densité en électrons. Elle est essentiellement composée de chitine et de glycoprotéines. La chitine a une fonction structurelle en formant des liens solides pour consolider le système fibrillaire de la spore. Elle joue également un rôle de barrière protectrice (23). Certains genres de microsporidies possèdent une membrane interne (ou plasmalemmes), sous l'endospore, et qui offre à la spore de nouvelles fonctions pour sa survie dans l'environnement et pour son développement intracellulaire.

Le tube polaire est l'organelle d'infestation cellulaire des microsporidies. Il est rattaché à l'extrémité antérieure de la spore par le disque d'ancrage et se retrouve dans le sporoplasme pour former des vrilles autour du noyau. La longueur du tube polaire et le nombre de vrilles diffèrent selon les espèces (jusqu'à 30 pour certaines) et peuvent servir à les identifier (22). C'est un organelle unique aux microsporidies avec une fonction très spécialisée. Cinq protéines appelées PTPs (Polar tube proteins) composent le tube polaire et lui permettent d'adopter une structure externe servant à délivrer le sporoplasme vers la cellule hôte sous l'action d'une augmentation de la pression intrasporale. Le tube polaire se retourne sur lui-même pour adopter une forme extérieure et laisser passer l'ensemble du sporoplasme à destination du cytoplasme d'une cellule cible (22,23,38).

D'autres structures ont été identifiées, telles que les polaroplastes antérieur et postérieur, qui correspondent à des couches membranaires regroupées autour du disque d'ancrage et du tube polaire, ou encore une vacuole postérieure.

Le noyau est entouré par les vrilles du tube polaire. Il comporte le matériel génétique du microorganisme. Lors de l'infestation d'une cellule hôte, il passe par le tube polaire pour être transféré dans le cytoplasme de la cellule infestée (23).

CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES D'ENTEROCYTOZON BIENEUSI

Enterocytozoon bieneusi présente un tropisme particulier pour les entérocytes, mais c'est une espèce capable d'infester les cellules épithéliales des voies biliaires. Elle peut également, dans de plus rares cas, infester les cellules bronchiques et de la muqueuse nasale. Son développement intracellulaire se déroule directement au contact du cytoplasme en absence de vacuole parasitophore, entre le pôle apical de l'entérocyte (bordure en brosse) et son noyau. Une croissance très rapide de la taille des mérontes dans un espace restreint va limiter leur nombre au sein de la cellule hôte. Les sporontes formés sont de grandes tailles (20 µm) et présentent chacun plus de 20 noyaux avec un tube polaire qui se développe au contact de chacun. Un sporonte est donc une grande structure qui va se modifier et opter pour une forme ovoïde. Par fragmentation et individualisation des noyaux et de leurs tubes polaires, les spores matures se forment et sont finalement de petites tailles. Elles sont constituées de structures matures permettant l'infestation de nouvelles cellules.

L'accumulation de ces nombreuses spores matures proches de la membrane apicale provoque une lyse de la cellule hôte. Par ce biais, les spores se retrouvent libérées dans la lumière intestinale. Elles peuvent alors infester de nouvelles cellules situées à proximité, être éjectées dans l'environnement, ou emprunter la voie hématogène pour disséminer dans le reste de l'organisme et infester de nouvelles cellules, à différentes localisations (22).

CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES D'ENCEPHALITOOZON INTESTINALIS

Affectant plus particulièrement les entérocytes, *Encephalitozoon intestinalis* infeste d'autres types cellulaires tels que les macrophages ou les cellules endothéliales, ce qui facilite sa dissémination dans l'organisme.

Cette espèce se développe dans sa cellule hôte sans être au contact du cytoplasme, à l'intérieur d'une vacuole parasitophore. La mérogonie se fait par des divisions binaires successives jusqu'à donner des mérontes possédant deux à quatre noyaux. Les spores matures mesurent entre 1,5 et 2 μm et sont libérées lors de la lyse cellulaire dans la lumière intestinale et le chorion, ce qui facilite leur dissémination dans l'organisme (22).

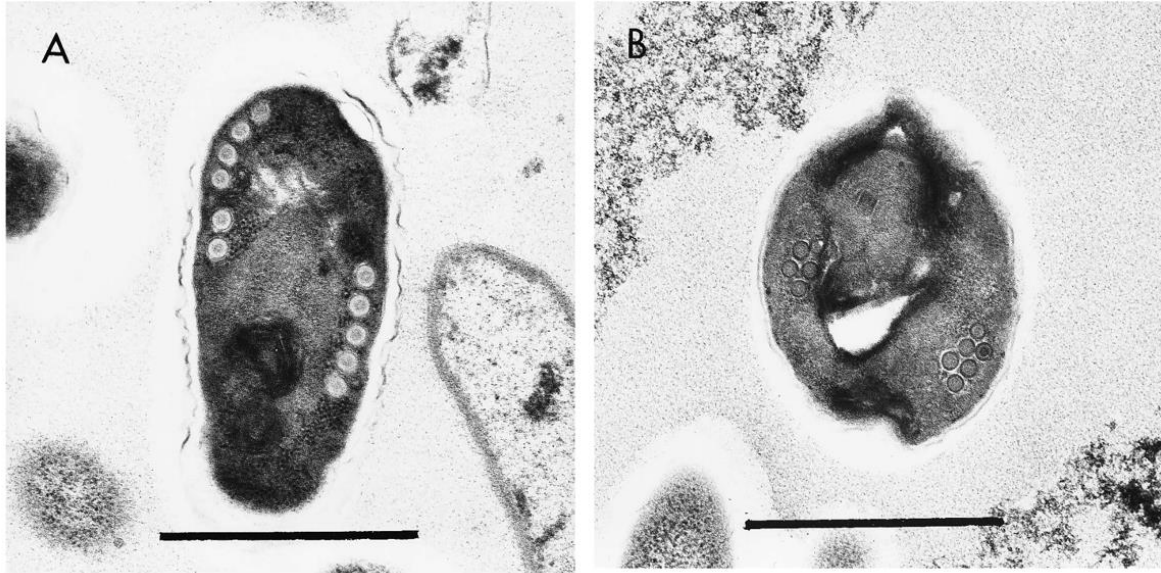


Figure 9. Photographies électroniques des spores d'*Encephalitozoon intestinalis* (A) et *Enterocytozoon bieneusi* (B). Magnification x337,500. Barre = 1 μm .

Source : De Girolami PC, Brown S, Ombrouck C, et al. Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with Weber's modified trichrome and Uvitex 2B strains. Journal of Clinical Microbiology, 1995.

CYCLE DE VIE

Le mode de transmission de la microsporidiose est oro-fécal. La spore résiste plusieurs mois dans l'environnement et la contamination se fait généralement soit par ingestion d'eau ou d'aliments dans un sol contaminé, soit par contact indirect avec des animaux de fermes, domestiques et sauvages (39). Il peut également y avoir inhalation de spores avec un passage par la voie nasopharyngée pour rejoindre l'œsophage et l'ensemble du tractus digestif (23). Au contact des entérocytes et dans un milieu favorable, la spore reçoit des stimuli qui induisent sa germination : des modifications physicochimiques internes (transferts d'ions, changement de pH, de pression osmotique...) provoquent une activation du tube polaire, où s'en suit une extravasation via le disque d'ancrage qui permet au tube polaire d'être extériorisé pour transpercer la membrane plasmatique de la cellule cible (Figure 11) (38).



Figure 10. Infestation *in vitro* d'une cellule rénale de singe par une spore d'*Encephalitozoon intestinalis*, par externalisation du tube polaire de la spore vers la cellule cible.

Source : Wittner M and Weiss LM. (Eds.) The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington, DC: ASM Press. 1999

Chez certains genres de microsporidies, la spore peut être phagocytée par une cellule hôte pour se retrouver dans une vacuole parasitophore. Lors de la germination du tube polaire, celui-ci franchit la membrane de cette vacuole pour transférer le sporoplasme et l'ensemble du matériel génétique dans le cytoplasme de la cellule, échappant ainsi au complexe du phagosome (40).

Une fois que le tube polaire a transpercé la membrane cellulaire par le pôle apical, il va servir de moyen de passage à l'ensemble du sporoplasme pour être déchargé dans la cellule infestée. Différentes conditions sont nécessaires pour rendre possible le transfert du matériel. Lorsqu'elles sont remplies, plusieurs mécanismes s'activent : modification du pH interne de la spore, cycle de déshydratation et de réhydratation, changement des flux calciques et anioniques, transferts extérieurs de cations et d'anions, etc ... (23).

En réponse à ces modifications, une entrée d'eau depuis l'extérieur de la spore vers le sporoplasme va provoquer une augmentation de l'osmolarité intrasporale, ce qui induit le déchargement des autres organelles vers le cytoplasme de la cellule cible, par le biais du tube polaire (23,41,42).

Le cycle intracellulaire débute par une phase de prolifération intensive : la mérogonie. Il y a une première différenciation de certaines structures au contact d'éléments cytoplasmiques pour atteindre le stade de méronte. La forme de différenciation varie selon les microsporidies, ce qui a permis de définir des genres au sein du phylum *Microspora* : certains genres présentent des formes mérontes uniques avec un noyau au sein d'un sporoplasme, alors que d'autres possèdent des structures sporoplasmiques présentant plusieurs noyaux au sein de leurs structures. De plus, les formes de division diffèrent selon les espèces (fissions binaires, élongations du sporoplasme avec plusieurs noyaux, plasmotomie...) (Figure 12).

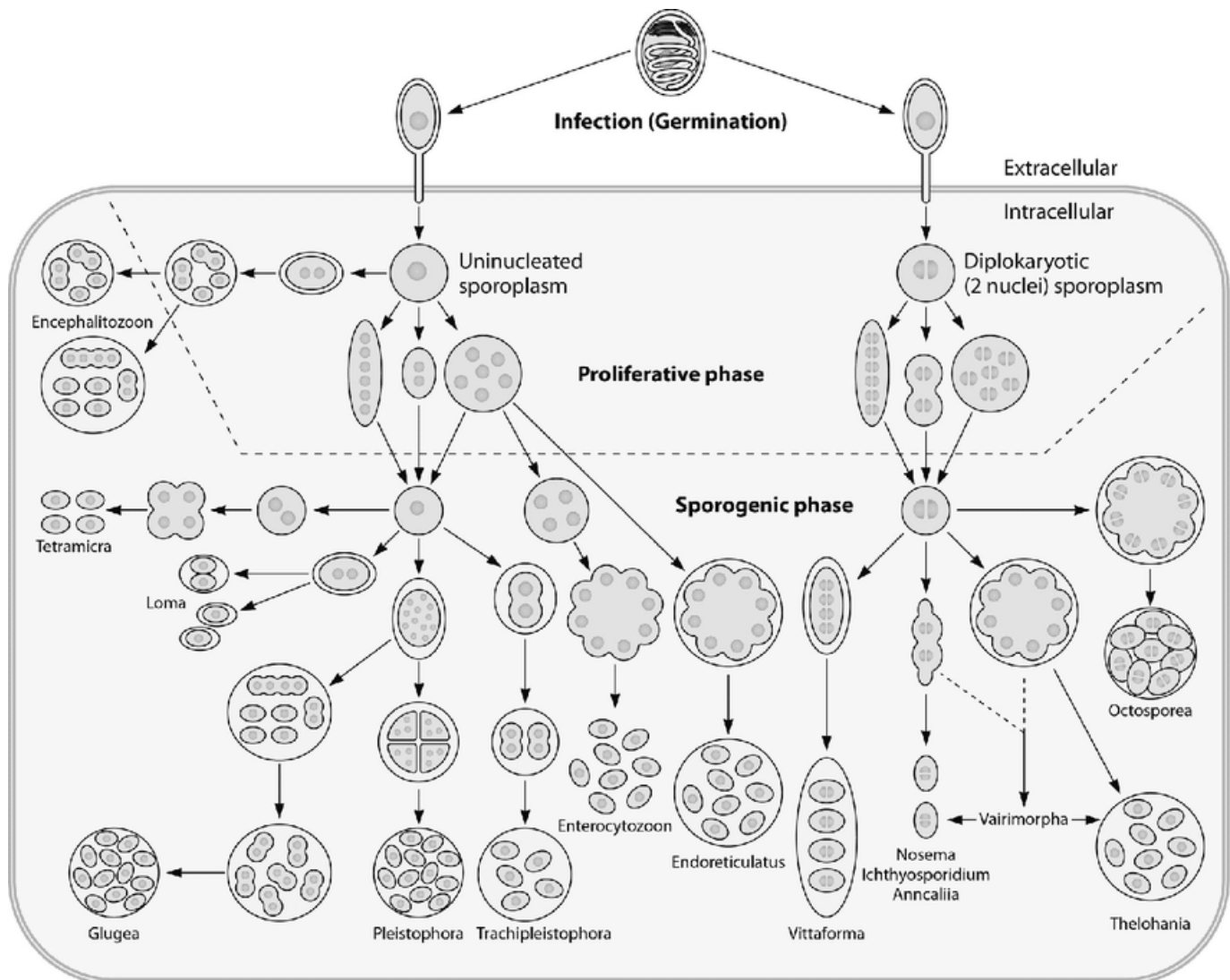


Figure 11. Cycle de vie intracellulaire des microsporidies.

Source : Franzen C. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. The Open Parasitology Journal. 2008;2:1-34.

Ces cycles de multiplication répétés ont lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte, au contact de ses organelles, et particulièrement près du réticulum endoplasmique. L'exception concerne le genre *Encephalitozoon*, qui se divise au sein d'une vacuole parasitophore. Par la suite, la sporogonie correspond à la formation de spores matures. Cette phase varie selon les genres de microsporidies : au contact du cytoplasme pour *Enterocytozoon* ou au sein de vacuoles parasitophores pour *Encephalitozoon*, par exemple. Cette phase se caractérise par la différenciation des structures et la formation de la paroi de la spore afin qu'elle devienne mature (23). La charge parasitaire trop importante provoque une rupture de la membrane cellulaire, entraînant la nécrose de la cellule et la libération des spores matures. Les spores se retrouvent alors au contact de nouvelles cellules pour recommencer le cycle d'infestation. Elles peuvent également se retrouver à nouveau dans l'environnement, ou se disséminer vers d'autres organes pour certaines espèces, dans des conditions bien particulières (22,23,43).

ENVIRONNEMENT

Les microsporidies sont des microorganismes ubiquitaires majoritairement retrouvés dans l'environnement aquatique (Figure 13). Des études épidémiologiques ont dénombré de nombreux cas de portage chez une large variété d'espèces animales (insectes, poissons, crustacés, oiseaux, mammifères...) (39,44–49).

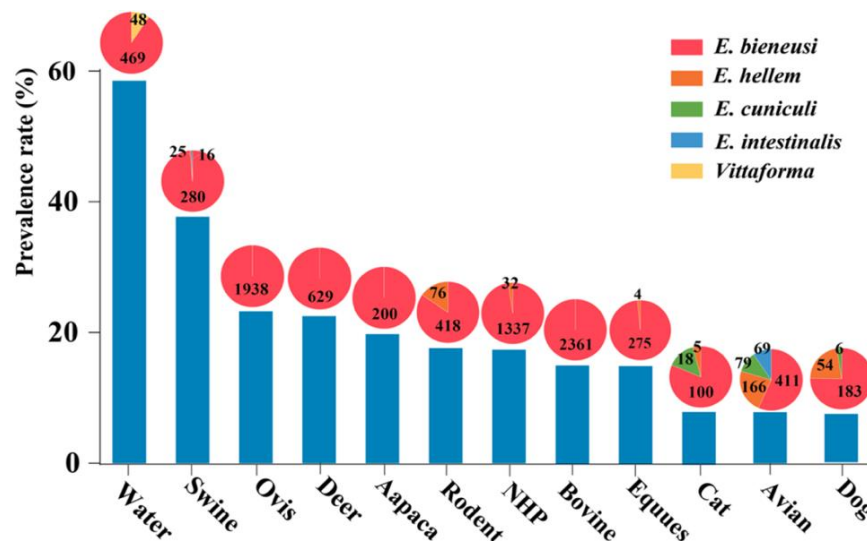


Figure 12. Répartition des microsporidies dans l'environnement et chez les animaux.

Ruan Y, Xu X, He Q, Li L, Guo J, Bao J, et al. The largest meta-analysis on the global prevalence of microsporidia in mammals, avian and water provides insights into the epidemic features of these ubiquitous pathogens. *Parasit Vectors*. 1 avr 2021;14(1):186.

Les microsporidies retrouvées chez les animaux varient non seulement en fonction des espèces concernées, mais aussi en termes de proportions selon les hôtes. Malgré que les microsporidies soient présentes en quantité variable – parfois absentes – chez plusieurs espèces animales, le genre *Enterocytozoon* demeure majoritaire chez tous les hôtes et dans tous les environnements étudiés (Figure 14) (44).

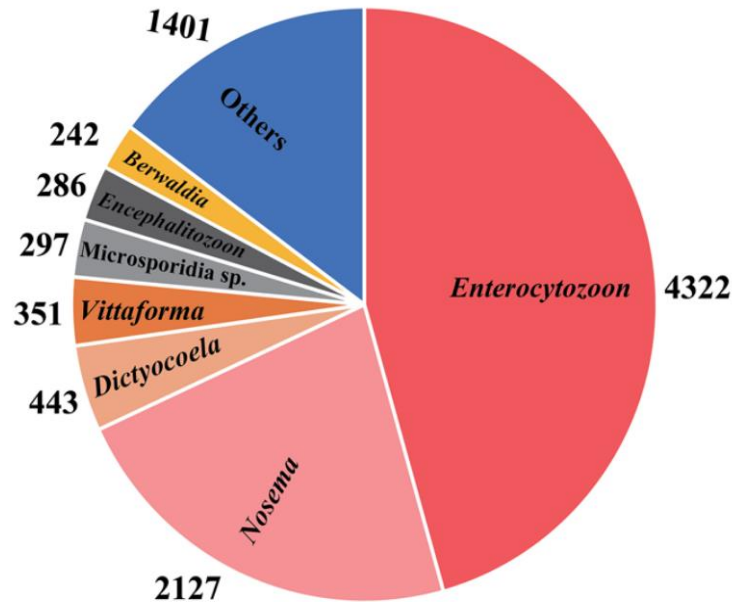


Figure 13. Genres des microsporidies retrouvées dans l'environnement et chez les animaux.

Source : Ruan Y, Xu X, He Q, Li L, Guo J, Bao J, et al. The largest meta-analysis on the global prevalence of microsporidia in mammals, avian and water provides insights into the epidemic features of these ubiquitous pathogens. *Parasit Vectors*. 1 avr 2021;14(1):186.

Chez la plupart des individus infectés (toutes espèces confondues), les signes cliniques les plus fréquents affectent principalement le tractus digestif, suivis, dans une moindre mesure, des organes reproducteurs, respiratoires, musculaires, excrétoires (reins, foie), ainsi que du système nerveux dans son ensemble (50).

La grande diversité en termes de lieux de contamination, d'espèces animales porteuses, d'espèces identifiées et d'atteintes cliniques, fait de la microsporidiose une pathologie complexe et hétérogène. Parmi les animaux porteurs, on retrouve notamment l'ensemble des primates, génétiquement proches de l'espèce humaine (47,48), ou encore les animaux domestiques tels que les chiens, les chats et les oiseaux, qui présentent une forte proximité avec l'Homme, d'un point de vue géographique et culturel (39).

LES PRIMATES ET LA MICROSPORIDIOSE

LA MICROSPORIDIOSE CHEZ L'HOMME

ÉPIDÉMIOLOGIE

Huit genres de microsporidies sont retrouvés chez l'Homme, pouvant être à l'origine de portages asymptomatiques ou responsables de maladies : *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Encephalitozoon*, *Vittaforma*, *Trachipleistophora*, *Brachiola*, *Nosema*, et *Microsporidium* (39,51). Parmi l'ensemble des espèces pathogènes, *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* sont les plus fréquentes, notamment chez le patient immunodéprimé (39,52).

Entre 2018 et 2021, 448 cas de microsporidioses ont été recensés en France. *Enterocytozoon bienewisi* était l'espèce la plus représentée, responsable de 95,9 % des cas. Plus rarement, des atteintes cliniques étaient provoquées par *Encephalitozoon intestinalis* (2,2 %) et *Encephalitozoon hellem* (1,9 %) (Figure 15) (53).

AGENTS RESPONSABLES DE MICROSPORIDIOSES EN FRANCE

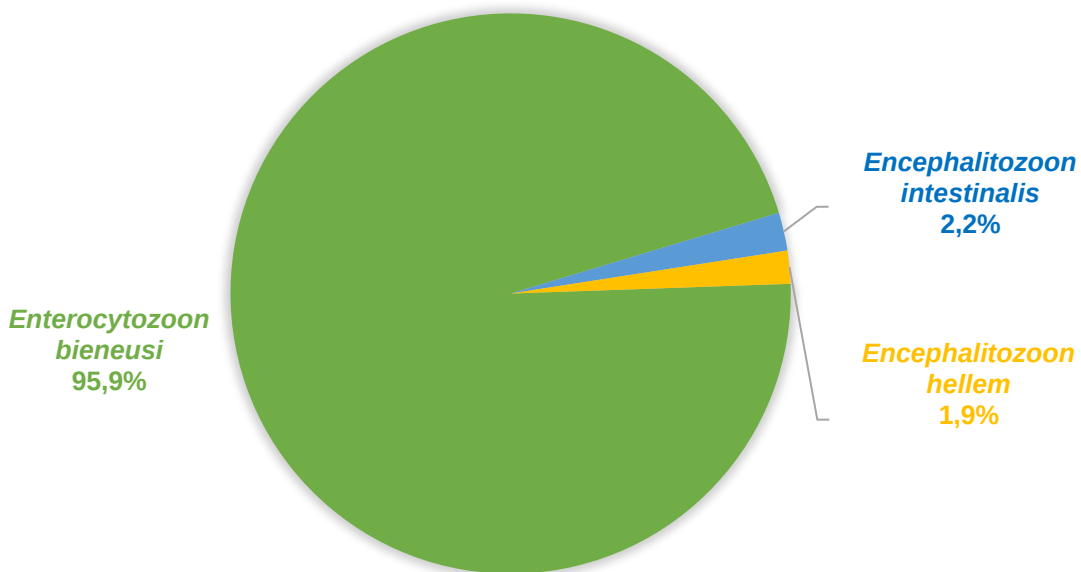


Figure 14. Chiffres basés sur 448 cas de microsporidiose rapportés entre 2018 et 2021, en France.
Source : Nourrisson C, Hamane S, Bonhomme J, Durieux MF, Foulquier JB, Lesthelle S, et al. Case series of intestinal microsporidiosis in non-HIV patients caused by *Encephalitozoon hellem*. Emerg Microbes Infect. 8 déc 2023;12(2):2258997.

La microsporidiose est une pathologie cosmopolite avec une prévalence variable selon les régions. Son incidence a nettement augmenté depuis l'épidémie de VIH dans la décennie 1980, pouvant aussi s'expliquer par la recrudescence du nombre de patients immunodéprimés. Onze des 14 espèces pathogènes pour l'Homme ont été découvertes depuis, incluant les plus fréquentes d'entre elles que sont *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem* et *Encephalitozoon cuniculi* (52). Avec l'essor des nouveaux traitements antirétroviraux qui a suivi dans les années 90, l'incidence a significativement chuté par levée de l'immunodépression des patients atteints du VIH, par la sortie du stade SIDA et par une restauration suffisante de leur immunité cellulaire (39,52,54).

PATHOGENICITE

L'immunodépression constitue le principal facteur de risque pour les patients atteints de microsporidiose, en particulier ceux infectés par le VIH au stade SIDA depuis les années 1980, ce qui a catégorisé la microsporidiose comme maladie opportuniste (39,55). Aujourd'hui, l'immunosuppression induite par les traitements des patients transplantés d'organes ou les personnes atteintes de pathologies immunitaires est devenue le principal facteur de risque, alors qu'elle n'était qu'un facteur secondaire à la fin du XX^e siècle (39,53,55). Cette évolution épidémiologique peut s'expliquer par une meilleure prise en charge du patient atteint du VIH, d'une part, et une augmentation du nombre de transplantations rénales, cardiaques ou hépatiques en raison de larges avancées dans ce domaine, d'autre part. Un taux limite de lymphocytes T CD4 < 100/mm³ a été documenté comme un facteur de risque correspondant à un déficit de l'immunité cellulaire suffisant au développement de la microsporidiose (22,39,53,56).

D'un point de vue épidémiologique, la question des microsporidioses a été étudiée en France, puisque le réseau de surveillance national des microsporidioses a recensé 448 cas de microsporidioses intestinales entre 2018 et 2021 sur le territoire français. 77 % d'entre eux concernaient des patients immunodéprimés. Les causes les plus fréquentes d'immunodépression des patients atteints sont la transplantation d'organe solide (72,4 %) et la séropositivité au VIH (15,2 %) (Figure 16).

CAUSES D'IMMUNODÉPRESSION DE PATIENTS ATTEINTS DE MICROSPORIDIOSE

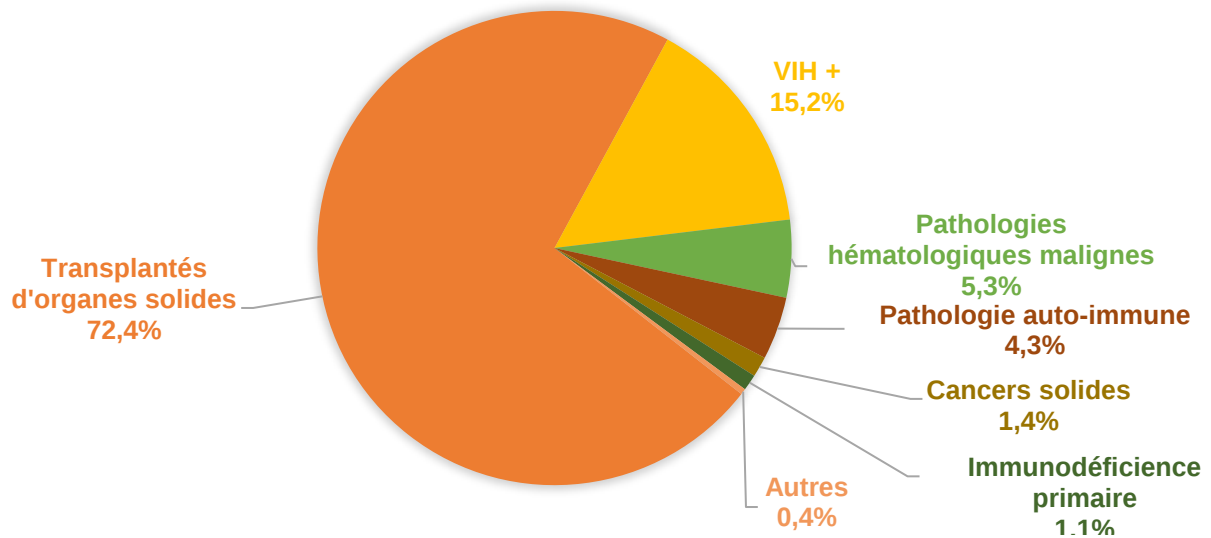


Figure 15. Chiffres basés sur 448 patients, entre 2018 et 2021, en France.

Source : Nourrisson C, Hamane S, Bonhomme J, Durieux MF, Foulquier JB, Lesthelle S, et al. Case series of intestinal microsporidiosis in non-HIV patients caused by *Encephalitozoon hellem*. Emerg Microbes Infect. 8 déc 2023;12(2):2258997.

De toutes les espèces de microsporidies, quatorze ont été identifiées comme pouvant être impliquées dans des infections. Souvent asymptomatiques, elles peuvent tout de même avoir des manifestations bénignes, chroniques, voire disséminées pour les cas les plus graves (57–59). Il existe des tropismes différents selon les espèces, comme le détaille le Tableau 1, en Annexe 1 (39,48,51,57).

Lors de la microsporidiose, l'atteinte clinique s'exprime principalement comme une diarrhée chronique aqueuse non sanglante. Chez les patients immunodéprimés, elle ne se résout pas spontanément et est souvent accompagnée de nausées, d'une perte d'appétit, de douleurs abdominales, d'une perte de poids ou encore de signes de malabsorption. Dans certains cas, les symptômes digestifs peuvent provoquer une déshydratation, pouvant évoluer vers la cachexie. Des formes graves – exceptionnelles – se manifestent par une dissémination systémique des microsporidies vers des organes spécifiques, selon le tropisme de l'espèce infectante.

Par exemple, *Enterocytozoon bieneusi* peut être retrouvé dans les voies biliaires (provoquant des cholécystites), dans les voies respiratoires (bronchites), ou dans le tractus oro-pharyngé, alors responsables de rhinites. *Encephalitozoon intestinalis* semble avoir un tropisme plus large, étant à l'origine de symptômes plus variés : des cas de sinusites, rhinites, bronchites, encéphalites, ou encore les kérato-conjonctivites sont fréquemment attribués à cette espèce de microsporidie. Enfin, la microsporidiose peut également entraîner une défaillance multiviscérale (22,23,39,47,51,52,57).

Parmi l'ensemble des cas rapportés de microsporidiose, d'authentiques infections digestives bien moins fréquentes ont été documentées chez des individus immunocompétents, principalement chez le voyageur ou l'habitant en zones tropicales. De façon plus anecdotique, des cas sporadiques d'infections oculaires provoquées par *Encephalitozoon cuniculi* chez des porteurs immunocompétents de lentilles de contact ont été rapportés (22,39).

DIAGNOSTIC

Le diagnostic de microsporidiose est posé en présence d'une symptomatologie évocatrice et par la mise en évidence d'une espèce pathogène, dans des prélèvements réalisés en fonction de la zone d'atteinte. Dans le cadre des microsporidioses intestinales, des selles sont prélevées chez des patients immunodéprimés avec des diarrhées aiguës ou chroniques sur trois jours différents. Pour un patient immunocompétent, la recherche de microsporidies n'est pas indiquée en première intention en raison de la faible prévalence et de la résolution spontanée de la diarrhée lorsqu'elle est provoquée par les microsporidies. En ce qui concerne les localisations extradiigestives, le prélèvement réalisé est fonction de la localisation suspectée (biopsies, liquide céphalorachidien, grattage cornéen, lavage broncho-alvéolaire...).

L'examen direct par microscopie est réalisable pour la recherche de microsporidies dans un prélèvement de selles. On réalise un frottis mince, où l'échantillon est étalé sur une lame, puis fixé à l'alcool, avant d'être coloré. La technique de Van Gool utilise un fluorochrome qui se fixe à la chitine, présente dans la paroi des spores. Celles-ci sont visibles en microscopie à fluorescence, aux grossissements x400 et x1000. C'est une méthode sensible mais peu spécifique, qui ne peut pas renseigner le nom de l'espèce de

microsporidie observée. La coloration trichromique de Weber est une autre méthode, moins sensible que la technique de Van Gool, et qui se base sur la microscopie optique (les spores apparaissent rouge pâle, visibles au grossissement x1000). D'autres examens directs existent, comme l'immunofluorescence indirecte, qui utilise des anticorps monoclonaux spécifiques à certaines espèces.

Plus sensible et plus spécifique que la microscopie, le diagnostic moléculaire s'est imposé comme un outil incontournable dans le diagnostic de la microsporidiose. L'amplification génique par PCR permet d'identifier l'espèce impliquée par l'utilisation d'amorces spécifiques des microsporidies les plus fréquemment responsables d'infections intestinales (*Enterocytozoon bieneusi* et le genre *Encephalitozoon*). Cette technique est devenue essentielle pour une prise en charge thérapeutique adéquate, car l'espèce impliquée dans la symptomatologie conditionne la ligne thérapeutique à mettre en place pour traiter efficacement le patient (60).

PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

Pour les patients immunocompétents, la résolution des diarrhées se fait spontanément en absence de traitement. En revanche, ce dernier est indispensable pour un patient immunodéprimé. Une levée de l'immunodépression est préconisée, associée à un traitement symptomatique et antifongique adapté. L'identification de l'espèce est essentielle, car elle détermine le traitement spécifique de première intention à adopter. Selon les recommandations de 2022, le traitement spécifique de la microsporidiose intestinale à *Enterocytozoon bieneusi* repose sur la fumagiline (20 mg x 3/jour). Pour *Encephalitozoon intestinalis*, la première intention consiste en l'administration d'albendazole (400 mg x 2/jour) pendant 2 semaines (61). Pour les patients au stade SIDA, l'amélioration clinique, la guérison et l'éradication parasitaire sont observées grâce à la restauration immunitaire induite par le traitement antirétroviral.

La microsporidiose reste une affection d'intérêt diagnostic et épidémiologique en raison de ses atteintes potentiellement graves et de l'étendue de la population à risque. Le diagnostic et le traitement de ces microorganismes est d'une importance capitale, car bien qu'elle reste minoritaire en termes de fréquence par rapport à d'autres pathologies opportunistes, elle présente une pathogénicité non négligeable.

LA MICROSPORIDIOSE CHEZ LES PRIMATES NON HUMAINS

Concernant les primates non humains (non human primates, NHP), le rassemblement de données de 15 études effectuées dans 16 pays différents, et portant principalement sur des espèces non hominoïdes (c'est-à-dire toutes les espèces simiesques qui n'incluent pas les grands singes), dénombre 1388 cas positifs porteurs de microsporidies sur 7009 individus, soit une prévalence de 18,5 % (44). Une comparaison entre les populations sauvages et en captivité a montré une différence statistiquement significative avec des prévalences respectives de 7,4 % et 21,2 % (44).

PATHOGENICITE CHEZ LES SINGES SAÏMIRI

Les infections à microsporidies sont bien documentées chez le singe saïmiri (*Saimiri sciureus*), chez qui les microsporidies sont responsables de mortalité infantile et néonatale relativement élevées, souvent provoquées par *Encephalitozoon cuniculi* (50). Les atteintes sont le plus souvent subcliniques, affectant essentiellement le tractus digestif et le système nerveux central des jeunes singes, présumés avec un système immunitaire absent ou immature (50,62). Plusieurs études menées chez ces singes en captivité montraient un impact majeur de la virulence des microsporidies par la présence de diarrhées, de cachexie et d'anorexie directement imputables à *Encephalitozoon hellem*. L'observation de lésions digestives typiques et la détection de l'ADN dans les selles, ou dans l'urine, ont renforcé le diagnostic (50).

Pour déterminer la pathogénicité d'*Encephalitozoon hellem* chez les singes saïmiri, des travaux menés ont pu étudier la moyenne de survie après administration de souches d'*Encephalitozoon hellem* par différentes voies. Par voie orale, la survie moyenne s'élevait à 110 jours, contre 27 jours par voie intraveineuse (63). Chez des individus en captivité positifs au virus de l'immunodéficience simienne (SIV), l'ADN fécal d'espèces appartenant au genre *Enterocytozoon* a été retrouvé dans 34 % des cas et toujours en présence de signes cliniques, principalement digestifs. En comparaison, des individus immunocompétents étaient porteurs du même genre à hauteur de 17 %. De plus, les spores persistaient pendant une longue période, car les échantillons restaient positifs pendant 262 jours en moyenne, sans symptôme. Parmi ces échantillons, 86 % étaient positifs à l'ADN d'*Enterocytozoon bieneusi* (64). Les résultats de ces études sont en

faveur d'un potentiel portage intestinal asymptomatique de microsporidies chez les singes saïmiri non immunodéprimés.

PATHOGENICITE CHEZ LES MACAQUES

L'immunodépression est un facteur de risque majeur d'infection par *Encephalitozoon cuniculi* et *Encephalitozoon hellem*, tous deux sont responsables d'une symptomatologie mortelle chez les macaques rhésus. Bien que ces espèces soient directement liées à la mortalité chez les singes immunodéprimés, d'autres espèces de microsporidies, telles qu'*Enterocytozoon bieneusi*, semblent également être des causes d'infections. Cette dernière est largement impliquée dans des infections spontanées chez plusieurs espèces de macaques (*Macaca mulatta*, *M. nemestrina*, *M. cyclopsis*) qui présentent une déficience immunitaire provoquée par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (50,65–67). Ce type d'infection est également observé chez l'animal immunocompétent, dans de plus rares cas. En Chine, la prévalence d'*Enterocytozoon bieneusi* a été étudiée chez neuf populations de macaques rhésus par PCR sur des échantillons de selles. Parmi 324 individus identifiés, 38 (11,7 %) étaient positifs. Il s'agissait de singes provenant de différentes populations et qui habitaient des territoires éloignés sur le sol chinois. Ces résultats marquent le caractère ubiquitaire du portage de cette espèce par ces populations simiennes (45).

Pour les macaques, cette infection affecte essentiellement le tractus digestif, se traduisant généralement par une importante diarrhée aqueuse chronique. Le système hépatobiliaire est également concerné par le parasitisme cellulaire et la multiplication des sporontes. Ceux-ci peuvent être à l'origine d'une cytolyse, d'une cholestase ou d'une fibrose tissulaire (65).

Une prévalence importante et une mortalité élevée chez les singes immunodéprimés font de la microsporidiose une pathologie majeure en santé animale, et par extension, en prévention pour la santé humaine. Bien qu'il existe un portage asymptomatique chez les singes immunocompétents, l'existence d'infections croisées avec l'Homme implique une compréhension poussée des mécanismes d'action et d'infestation des microsporidies, ainsi qu'une étude de leur impact épidémiologique, dans l'objectif de prévenir l'émergence de nouvelles épidémies.

PATHOGENICITE CHEZ LES GRANDS SINGES NON-HUMAINS

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'épidémiologie de la microsporidiose chez les grands singes. Cependant, il semblerait que les grands singes soient des hôtes porteurs de microsporidies : ils peuvent être asymptomatiques et servir de réservoirs, ou présenter des formes cliniques de microsporidiose identiques à celles des autres singes, comme les macaques rhésus ou les singes saïmiri. Que les individus soient immunodéprimés ou immunocompétents, des signes cliniques peuvent s'exprimer à différents degrés de sévérité, selon leur statut immunitaire ou l'espèce infectante. D'autres facteurs, similaires à ceux des macaques rhésus cités précédemment, peuvent influencer l'atteinte et la gravité de l'infection (67–72).

Une forte prévalence des microsporidies chez des individus en captivité dans des zoos européens et des sanctuaires africains a déjà été démontrée (73). Le genre *Encephalitozoon* demeure prépondérant, avec une large prévalence d'*Encephalitozoon cuniculi* seul (83/237 échantillons), et dans une moindre mesure, *Encephalitozoon hellem* associé à *Encephalitozoon cuniculi*. Par ailleurs, une différence significative a été observée entre les zoos européens, où 20 % des grands singes étudiés sont porteurs de microsporidies, et les sanctuaires africains, où ce taux atteint 53 % (73).

En Ouganda, les gorilles des montagnes (*Gorilla gorilla beringei*) sont en contact, de plus en plus régulièrement, avec les populations humaines et s'habituent à leur présence. Ils vivent dans des parcs naturels, à proximité de plusieurs communautés humaines différentes (membres de l'équipe de soins, habitants vivant à proximité dans le même environnement, touristes...) (69). L'intensification de cette proximité a suscité l'hypothèse d'une augmentation des transmissions de germes responsables d'anthropozoonoses, y compris des microsporidies. L'exemple d'*Encephalitozoon intestinalis* a été étudié en raison de la documentation limitée concernant cette espèce, malgré son portage et sa symptomatologie non négligeable. L'ADN d'*Encephalitozoon intestinalis* a été recherché dans 100 échantillons de selles des gorilles des montagnes du Bwindi Impenetrable National Park (population de 43 individus), et chez 66 êtres humains en contact avec eux : cinq étaient positifs (les deux qui ont été détectés chez les humains concernent le personnel travaillant auprès des singes). Le séquençage de la région ITS SSUrDNA de toutes les souches a retrouvé un génotype commun (génotype SIU09929). Une

comparaison avec une banque de données prouvait une similarité avec des souches retrouvées chez l'Homme (69). Les gorilles des montagnes et l'être humain pourraient donc être des réservoirs potentiels d'une même souche, ce qui indique une contamination commune entre l'Homme et le gorille, ou une transmission inter-espèces (69).

Le contact rapproché des grands singes avec l'Homme constitue un paramètre crucial à prendre en compte pour établir un risque de transmission, comme le démontre cette étude. En effet, si des singes de réserves naturelles ayant des contacts occasionnels avec des êtres humains sont sujets à des transmissions inter-espèces, nous pouvons nous interroger sur le risque encouru avec les singes en captivité, qui sont en contact quotidien avec l'Homme. Des études comparatives entre des populations simiennes sauvages et des populations captives permettraient de préciser le risque de transmission des microsporidies entre les grands singes et l'Homme.

FOCUS SUR L'ETUDE MICROMONKEY

CONTEXTE

L'augmentation de la densité humaine, le tourisme animalier sauvage de masse, les conflits géopolitiques, associés à une modification des biomes et des habitats naturels des grands singes (déforestation, urbanisation...), ont provoqué une augmentation de la proximité entre l'Homme et les grands singes (73,74). En prenant l'exemple de l'Ouganda, plusieurs populations de gorilles des montagnes vivent maintenant près des populations humaines (69,75). Des études réalisées dans plusieurs parcs zoologiques à travers le monde ont mis en lumière la forte prévalence et le risque de transmission que présentent les microsporidies. Cent vingt-sept échantillons de selles de toutes espèces animales, recueillies dans deux zoos portugais, retrouvaient une prévalence de 1,6 % pour *Enterocytozoon bieneusi*, s'élevant à 18,2 % chez les primates non humains non hominoïdes, avec des souches à haut potentiel zoonotique (76). En Asie, plusieurs zoos chinois sont confrontés à une grande diversité et à une forte prévalence d'*Enterocytozoon bieneusi* chez les primates non humains non hominoïdes, allant jusqu'à 45 % des individus captifs (77). Enfin, c'est dans les grandes réserves naturelles accueillant des

primates sauvages que la prévalence retrouvée est la plus importante, où près de 70 % des NHP non hominoïdes sont porteurs de microsporidies (78,79).

La proximité grandissante entre l'Homme, l'animal captif et l'animal sauvage semble présenter un impact sur la prévalence des microsporidies au sein des différentes populations ici décrites. Les animaux vivant en captivité montrent une prévalence plus importante que leurs homologues sauvages (76–79), de par leur exposition à un environnement où se disséminent de nombreuses spores avec des échanges plus faciles de celles-ci avec d'autres animaux porteurs, Homme compris. Si des changements induisent des rapprochements de différentes populations sujettes au portage des microsporidies, alors l'épidémiologie de ces microorganismes s'en verra impacter. En revanche, le risque zoonotique semble logiquement moindre par rapport à des individus vivant en captivité et quotidiennement en contact avec des humains.

Le projet microMONKEY se présente comme une étude prospective multicentrique qui cherche à dépeindre l'épidémiologie de la microsporidiose et l'impact du lien étroit qui existe entre l'Homme et les autres grands singes. Qu'ils soient sauvages ou captifs, l'étude du portage de microorganismes responsables de pathologies chez l'Homme porte un intérêt particulier permettant la compréhension des moyens de circulation des souches pathogènes. Par extension, il vise à comprendre les conséquences écologiques des zoonoses digestives et des flores microbiennes, dans un environnement en proie à de nouveaux changements. La compréhension des méthodes de circulation de ces agents constitue une base nécessaire à la prévention des pathologies qu'ils engendrent.

OBJECTIFS

C'est dans cette optique que ces travaux visent à évaluer la prévalence du portage des espèces *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* chez les grands singes vivant dans les zoos et les réserves naturelles. Par ce biais, des analyses approfondies des cas positifs permettront d'explorer la circulation des souches entre l'Homme et les grands singes et d'appréhender leur potentiel zoonotique par comparaison des génotypes circulants. Dans un second temps, l'étude de la composition du microbiote digestif pourrait

être utile pour identifier les genres et espèces microbiennes que l'on retrouve selon les localisations géographiques, et prouver l'existence du portages de certains pathogènes.

La prévalence sera étudiée à partir d'échantillons de selles de grands singes, recueillies et conservées pour réaliser une extraction ADN suivie d'une amplification par technique de PCR quantitative (qPCR). Le séquençage haut débit des souches par technique NGS des régions ITS et/ou de quatre loci (un minisatellite MS4 et trois microsatellites : MS1, MS3 et MS7) permettra d'étudier les profils génotypiques des souches d'*Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* retrouvées. L'analyse du microbiote fécal sera également réalisée à l'aide du séquençage NGS sur les échantillons de selles des grands singes inclus dans l'étude.

MATERIELS & METHODES

POPULATIONS SIMIENNES ETUDIEES

La super-famille des *Hominoidae* se compose de cinq sous-familles : les Hylobatoïdes (gibbons), les Pongidés (Orangs-outans), les Gorillinés (gorilles), les Paninés (chimpanzés) et les Hominines (l'Homme) (Figure 17) (74–79).

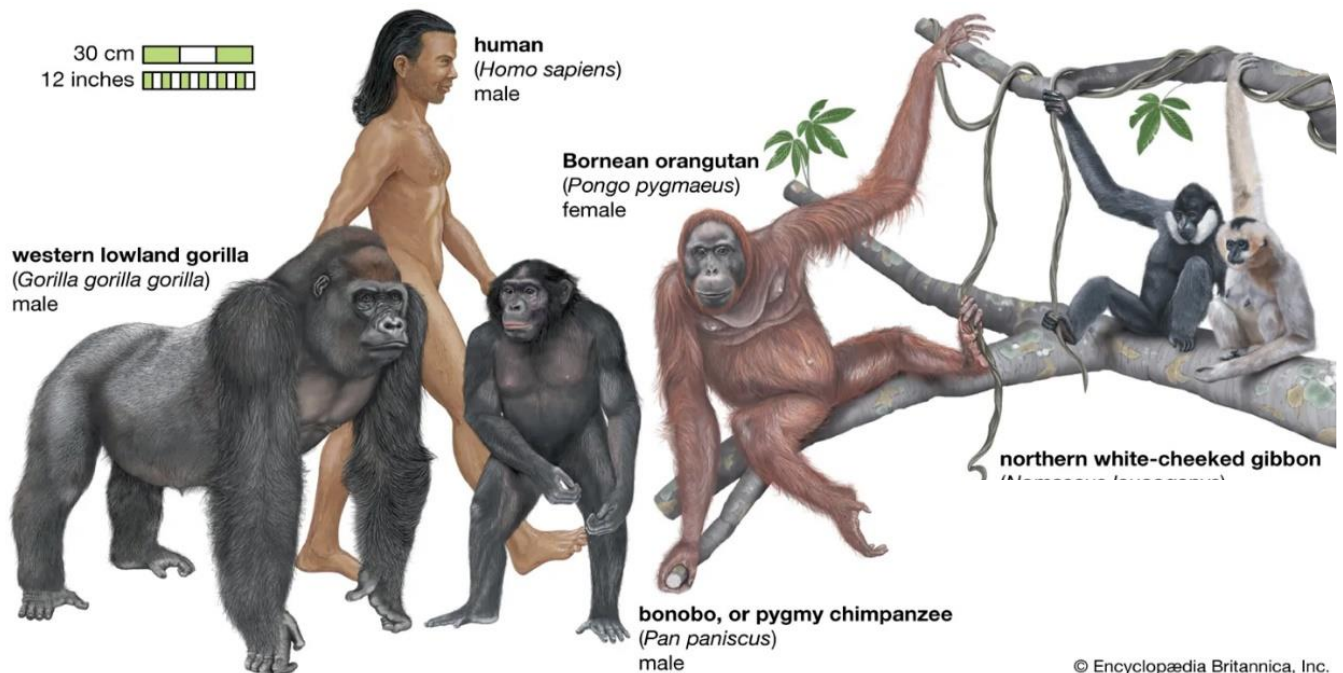


Figure 16. Représentation graphique des espèces de la super-famille des *Hominoidae*.
Source : *Encyclopedia Britannica*. Napier JR, Groves CP. Primate.

Les grands singes, bien que retrouvés sur l'ensemble des continents en captivité (pour la majorité des espèces), vivent à l'état sauvage au sein d'aires géographiques restreintes en Afrique de l'Est, en Afrique centrale et en Asie du Sud-Est (Figure 18) (81,82,83).

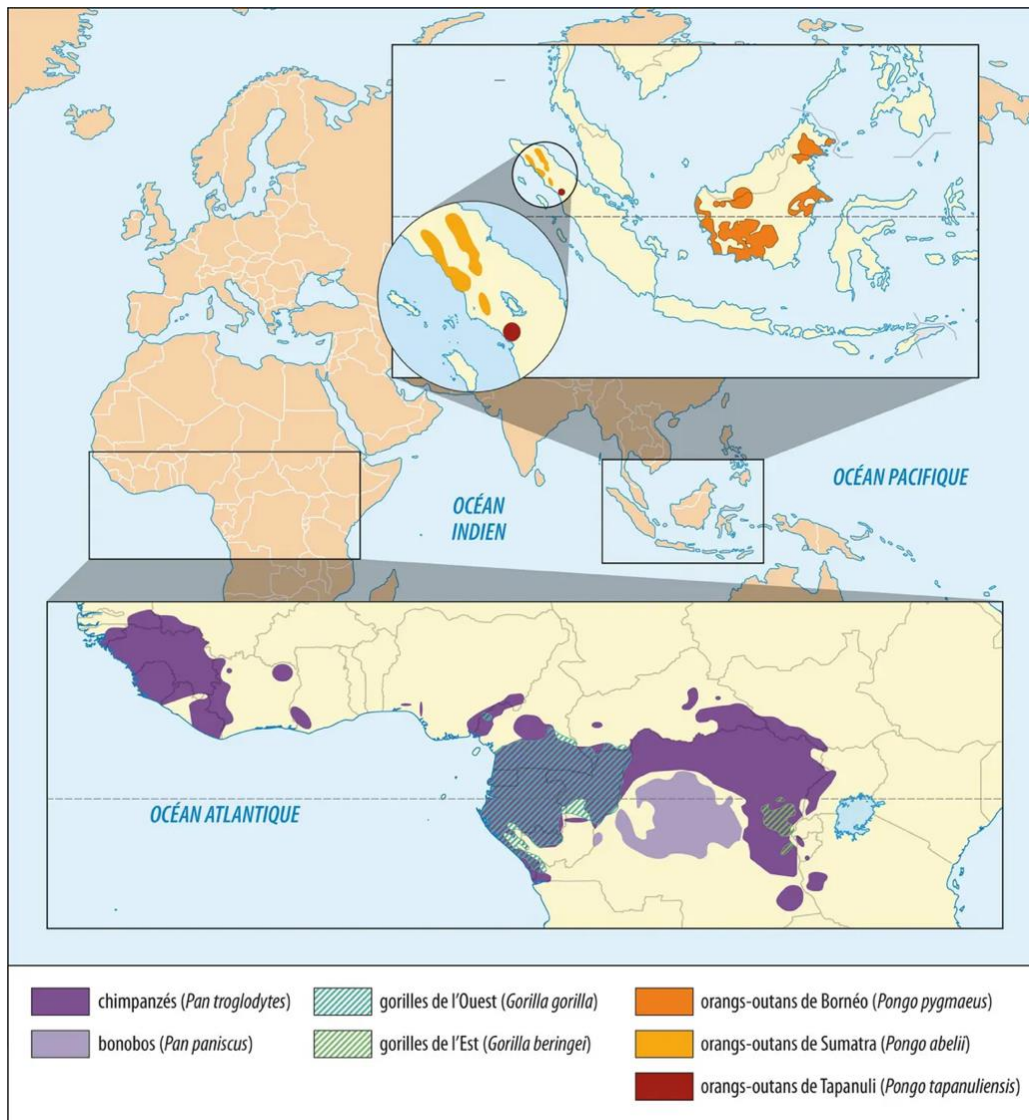


Figure 17. Répartition géographique des grands singes en Afrique et en Asie du Sud-Est.
Source : *Encyclopædia Universalis France*.

Les espèces de grands singes étudiées dans le projet microMONKEY sont uniquement des grands singes africains. Pour ce qui est des espèces sauvages, il s'agit des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) et des deux sous-espèces de gorille de l'Est que sont les gorilles des montagnes (*Gorilla beringei beringei*), que l'on retrouve au parc national des volcans du Rwanda (70), et les gorilles des plaines de l'Est (*Gorilla beringei graueri*).

RESERVES AFRICAINES ET CENTRES ZOOLOGIQUES PARTICIPANTS

Les populations simiennes étudiées originaires de réserves naturelles africaines sont issues de plusieurs réserves : parc national des Virunga (République démocratique du Congo), parc national de Gombe (République unie de Tanzanie), Île de Ngamba (Ouganda), parc national de la forêt de Kibale (Ouganda), forêt impénétrable de Bwindi (Ouganda), parc national des volcans (Rwanda) et du parc national de la forêt de Nyungwe (Rwanda) (Figure 19) (85).

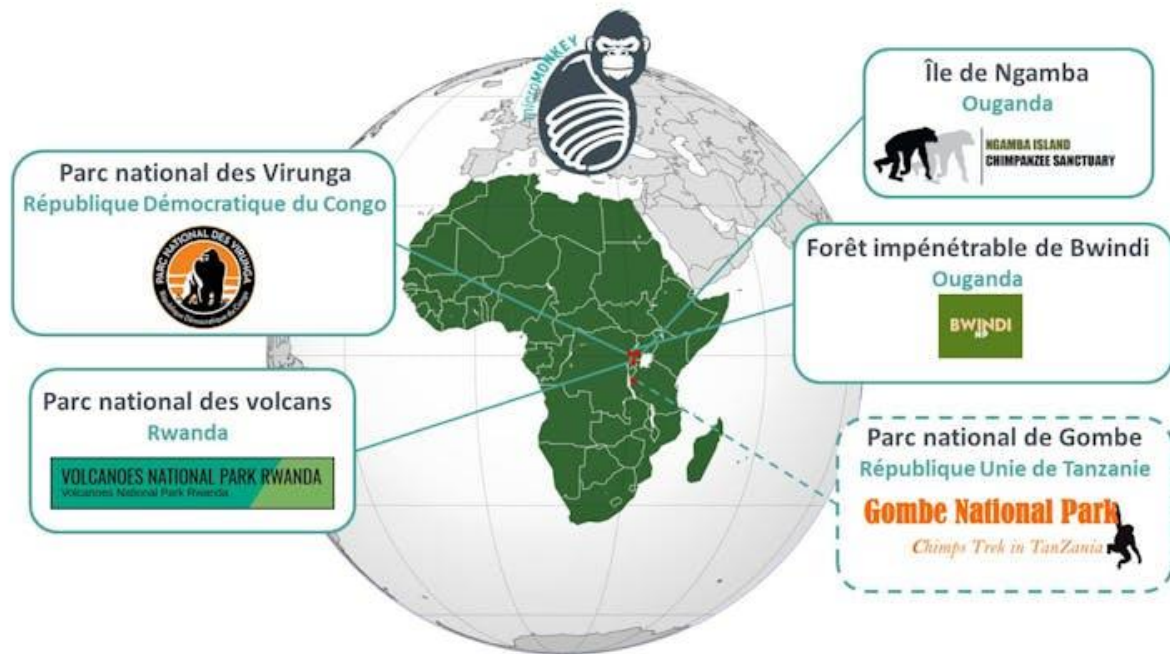


Figure 18. Parcs zoologiques et réserves africaines participant à l'étude microMONKEY.

Source : The Conversation, Desoubreaux G. Maladies émergentes : Le projet MicroMonkey traque la microsporidiose chez les grands singes d'Afrique. 17 mars 2022.

En Europe, les parcs zoologiques qui participent à l'étude sont : ZooParc de Beauval, Zoo de la Flèche, Parc Zoologique de Barcelone, la ménagerie du jardin des plantes de Paris, le BioParc de Doué-la-Fontaine, le Budapest Zoo & Botanical Garden, Zoologischer Garten Berlin, Zoo antwerpen, ZSL London Zoo, Diergarde Blijdorp, la réserve zoologique de la Haute-Touche et le parc zoologique de Paris. Des échantillons de selles d'autres primates non humains (babouins, singes bleus, singes vervet...) seront également prélevés afin de constituer un groupe contrôle.

COLLECTE ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La collecte de selles non liquidiennes des individus étudiés est réalisée sur place, au sein des réserves naturelles et des enclos des parcs zoologiques. Le prélèvement est effectué

à l'aide d'une cuillère en plastique à usage unique servant à le placer dans un pot à échantillon. Une noix de selle est suffisante car l'analyse ne nécessite qu'une petite quantité pour extraire assez d'ADN pour l'étape d'amplification par PCR (au minimum, environ cinq grammes). Une fois identifiés à l'aide d'étiquettes codées à 8 chiffres, les échantillons sont triés, et les informations correspondantes à chacun sont tracées dans un tableau listant : la date du prélèvement, l'identification de l'espèce animale et la localisation de l'échantillon lors de sa collecte (centre et habitat).

À chaque échantillon prélevé, est ajoutée une solution de Preservative RNAlater Buffer® afin de conserver l'ADN intact à température ambiante, avant la congélation de la selle et l'extraction de l'ADN cible au laboratoire. Une autre solution de conservation (NucliSens EasyMAG® BioMérieux) est également ajoutée pour inactiver et prévenir tout risque infectieux pouvant provenir de l'échantillon.

L'ensemble des prélèvements sont rapatriés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie-Médecine tropicale du Centre hospitalo-universitaire (CHU) de Tours, en France, où ils sont conservés dans une chambre froide à -20°C dans des containers hermétiques, avant l'étape d'extraction d'ADN. Les échantillons ne pouvant pas être rapatriés dans l'immédiat au laboratoire du CHU sont directement conservés sur les sites de collecte en attendant d'être stockés au laboratoire.

PCR QUANTITATIVE

L'étape d'extraction de l'ADN microbien à partir d'échantillons de selles est réalisée avec le kit ADN QIAamp PowerFecal Pro®, conformément au protocole d'extraction détaillé en Annexe 2. Une colonne de billes sert à la séparation et l'isolement de ces fragments ainsi qu'à l'élimination d'inhibiteurs initialement présents dans l'échantillon (86). Le principe d'extraction repose sur une succession de réactions chimiques et de séparations au travers de la colonne, incorporées de phases d'homogénéisation et de centrifugation. Une faible quantité d'échantillon (environ 0,25 gramme de selles) est mélangée à une solution de lyse cellulaire qui détruit les bactéries et les cellules des champignons afin de libérer l'ADN contenu à l'intérieur lors d'une phase d'homogénéisation (2000 rpm x 30s, 30s puis 2000 rpm x 30s) qui sépare l'ensemble des débris fécaux de l'ADN microbien. Après centrifugation, le surnageant, qui contient les fragments d'ADN, est récupéré puis

transféré dans un tube avec une solution qui joue un rôle de capture des inhibiteurs de PCR dans l'échantillon. Le surnageant est transféré dans une colonne chromatographique à microbilles qui capturent l'ADN pour le séparer du reste. Une solution, lors de lavage successifs, purifie l'extrait avant qu'il ne soit élué grâce à une solution d'élution. Deux microlitres d'un contrôle d'inhibiteur de PCR (Universal Inhibition Control DIA-UIC (Cy5)-050 Cont DNA 4.10*3) sont directement ajoutés à l'éluat, qui servira de contrôle interne lors de l'amplification ADN. Les extraits sont stockés à -20°C au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Tours si l'étape d'amplification n'est pas réalisée à la suite de l'extraction.

Des amorces spécifiques sont utilisées pour amplifier la région ITS conservée de l'ADN de la petite sous-unité ribosomale d'*Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon sp.* La PCR quantitative utilise 5 µL d'ADN extrait de l'échantillon pour un volume total de 25 µL, comprenant entre autres, 2 x 0,5 µL d'amorces pour *E. bieneusi* (Eb1 et Eb5), 0,5 µL de sonde de détection d'ADN *E. bieneusi* (EbS2), 2 x 0,5 µL d'amorces pour *Encephalitozoon* (FEI1 et REI1), 0,5 µL de sonde de détection d'ADN *Encephalitozoon* ainsi que 0,5 µL de contrôle d'inhibition (Univ Inhibition Control), pour valider l'amplification des échantillons. Le témoin positif utilise 5 µL d'ADN d'échantillons de selles de patients humains du CHU de Tours connus positifs pour *E. bieneusi* et/ou *Encephalitozoon sp.* Pour le témoin négatif, il s'agit de 5 µL d'eau stérile. La composition précise de chaque puit est décrite dans le protocole détaillé de l'étape d'amplification ADN, en Annexe 3.

Les mix sont déposés dans les puits d'une plaque de 96 puits Lightcycler® (référence 04729692001, Roche), où les échantillons et le témoin positif sont déposés en double selon un plan de plaque préalablement complété. Le témoin négatif n'est déposé que dans un puit. La plaque est ensuite recouverte d'un film plastique pour être centrifugée, afin d'homogénéiser les dépôts.

L'automate servant à réaliser la réaction d'amplification est le Lightcycler® 480 II (Roche) avec l'aide du logiciel LightCycler® 480 Software, qui réalise le programme d'amplification prédéfini. Le protocole est le suivant : Décontamination pendant 2 minutes à 50°C, Incubation à 95°C pendant 10 minutes, puis Amplification avec 50 cycles se composant

chacun d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et une étape d'hybridation à 63°C pendant 60 secondes.

GENOTYPAGE

L'identification génotypique des souches isolées d'*Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* est réalisée par une méthode de séquençage qui cible la région ITS de l'ADN de la petite sous-unité du ribosome eucaryote. Les extraits d'ADN (avant l'étape d'amplification) conservés au CHU de Tours seront traités au centre national de référence (CNR) des microsporidies, au CHU de Clermont-Ferrand. L'ADN extrait y sera amplifié grâce à des amorces spécifiques (MSP3 et MSP4B) (60) pour que la séquence soit comparable à la banque du National Centre for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, États-Unis), à l'aide du logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis®. Il sert à déterminer le génotype de chaque souche (87).

La technique de pointe utilisée dans l'étude microMONKEY est le séquençage MLST (*multilocus sequence typing*). Il permet d'obtenir une identification génotypique précise car il combine le séquençage de la région ITS à celui de quatre autres marqueurs génétiques : le minisatellite MS4 et les trois microsatellites MS1, MS3 et MS7. Il s'agit de fractions du génome hautement répétées et fréquemment porteuses d'erreurs de réplication. De cette manière, ils sont la marque d'une variabilité interindividuelle selon le nombre de répétitions qu'ils possèdent. Il s'agit donc de cibles de choix afin de déterminer des différences génétiques précises entre plusieurs individus d'une même espèce.

Le logiciel Clustal Omega algorithm® permet l'alignement des séquences et attribue à chacune un code ainsi qu'un « sequence type » (ST) (88). Chaque génotype retrouvé sera confronté avec des séquences connues, issues de la base de données publique GenBank® (89) afin de les classer. Cette catégorisation des souches selon leurs génotypes est très utile. Grâce à elle, il est, par exemple, possible de déterminer une origine géographique commune pour plusieurs souches. Par comparaison avec des échantillons positifs provenant de singes sauvages, captifs ou d'êtres humains, il sera plus aisé d'évaluer un risque zoonotique pour chaque génotype et d'exposer ceux qui présentent un risque important de transmission inter-espèces. On pourra, entre autres,

émettre des hypothèses sur les modes de dissémination et de contamination de souches bien précises.

ANALYSE DU MICROBIOTE FECAL

L'analyse du microbiote fécal permet de dresser un profil détaillé de la flore intestinale des grands singes africains étudiés. C'est un outil puissant, qui offre une opportunité précieuse pour la surveillance et la gestion de leur état de santé. Elle est également très utile pour mieux comprendre l'influence de l'environnement sur l'équilibre microbien digestif et, par extension, sur le bien-être général des grands singes d'Afrique.

Afin de fournir la liste la plus exhaustive possible des germes que l'on retrouve dans les échantillons, l'ensemble des extraits d'ADN sont traités par séquençage NGS. Le segment 16S de l'ADN ribosomal des bactéries et les régions ITS des champignons sont spécifiquement ciblées, afin d'identifier les espèces présentes dans chaque échantillon. L'automate utilisé au CHU de Tours est le MiSeq system (Illumina™) avec les kits QIAseq 16S/ITS Screening Panel® (Qiagen™) et flowcell standard v.3 reagent (Illumina™).

Une fois le séquençage de ces régions réalisé, une analyse bio-informatique associera les fragments correspondants entre eux pour obtenir les séquences complètes des différents génomes présents dans l'échantillon. La comparaison de ces séquences ainsi obtenues à plusieurs banques de données permettra d'attribuer chacune d'entre elles au germe correspondant. Une fois l'ensemble des germes identifiés, le microbiote fécal est alors reconstitué.

L'étude des microbiotes fécaux repose sur des analyses multivariées utilisant une approche comparative. En confrontant les microbiotes des échantillons étudiés avec ceux appartenant à d'autres individus, il devient possible de détecter des différences inter- et intra-individuelles. Des représentations graphiques claires faciliteront la mise en évidence de ces distinctions, permettant de constituer des groupes et des sous-groupes d'individus partageant des microbiotes similaires. L'objectif de cette démarche est de fournir une base solide pour de futures études épidémiologiques. Elles pourront s'appuyer sur ces résultats pour explorer les liens entre les environnements des individus au sein d'un même groupe, ainsi que leur proximité avec d'autres singes (qu'ils soient sauvages captifs), voire avec l'Homme.

CONCLUSION

MicroMONKEY est une étude innovante, notamment par son sujet, puisque les microsporidies font partie des agents pathogènes négligés. Catégorisées comme d'importance secondaire par le CDC, et longtemps écartées, peu d'études ont été menées à leur sujet dans le domaine de la santé humaine. Des articles ont déjà démontré que les microsporidies présentent une grande diversité, compte tenu du grand nombre d'espèces, ainsi qu'une importante diversité génétique intra-espèce, avec de nombreux génotypes déjà identifiés. Cependant, la plupart des études ont été menées chez les animaux, et aucune n'a été réalisée spécifiquement chez les grands singes africains. Le projet microMONKEY se distingue également par l'utilisation d'une technique de génotypage précise de pointe. L'objectif principal est d'apporter davantage d'arguments concernant le risque microbiologique des microsporidies auquel les grands singes africains sont exposés, tout en mettant en lumière un risque zoonotique pouvant avoir des répercussions importantes sur la santé humaine. L'expansion du réservoir des microsporidies et leur transmission entre chimpanzés, gorilles et humains sont des inconnues que le projet cherche à éclaircir.

Il s'agit d'une étude qui s'inscrit pleinement dans les préoccupations actuelles en matière d'environnement, de santé publique et de bien-être animal. La santé repose sur trois piliers interconnectés, et le concept One Health est un outil puissant de surveillance et d'organisation pour contrôler, entre autres, les problèmes liés à l'émergence de pandémies. Ainsi, cette étude se présente comme une opportunité de renforcer la santé des animaux sauvages et captifs, ainsi que de préserver les faunes et les flores locales, par une meilleure compréhension de leur écosystème et, par conséquent, des microorganismes qui en font partie.

Le projet microMONKEY est donc une avancée pertinente dans la protection des grands singes africains et dans le renforcement de la santé humaine mondiale par la sensibilisation des populations et des organismes politiques concernés. Il agit pour une meilleure compréhension des liens invisibles qui unissent les espèces dans un écosystème fragile et en constante évolution.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Organisation mondiale de la santé. Une seule santé [En ligne]. 23 octobre 2023 [cité le 17 avril 2024]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/one-health>
2. Mackenzie JS, Jeggo M. The One Health Approach—Why Is It So Important? *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 31 mai 2019;4(2):88.
3. Organisation internationale pour les Migrations. Préparation et réponse aux épidémies. [En ligne]. Date de publication inconnue [cité le 6 juillet 2024]. Disponible sur : <https://www.iom.int/fr/preparation-et-reponse-aux-epidemies>.
4. Robert A. Cook, William B. Karesh, and Steven A. Osofsky. Conference Summary One World, One Health: Building Interdisciplinary Bridges to Health in a Globalized World. [En ligne]. 29 septembre 2004 [cité le 17 avril 2024]. Disponible sur : http://www.oneworldonehealth.org/sept2004/owoh_sept04.html
5. [notre-environnement.gouv.fr](https://www.notre-environnement.gouv.fr/). Pourquoi le moustique tigre inquiète-t-il autant ? [En ligne]. 23 août 2023 [cité le 8 juillet 2024]. Disponible sur : <https://www.notre-environnement.gouv.fr/>
6. INRAE. Pour que durent les résistances. [En ligne]. 29 juin 2020 [cité le 8 juillet 2024]. Disponible sur : <https://www.inrae.fr/actualites/durabilite-resistances>
7. Mackenzie JS, Jeggo M, Daszak P, et al. One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases : The Concept and Examples of a One Health Approach. Berlin, Heidelberg : Springer, 2013; p. 1-13.
8. CDC. About One Health. [En ligne]. 17 juillet 2024 [cité le 28 juillet 2024]. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/onehealth/index.html>
9. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*. 2001;356(1411):983-9.
10. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*. 2001;356(1411):991-9.
11. Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases journal*. 2005;11(12):1842-7.
12. CDC. About Zoonotic Diseases. [En ligne]. 29 février 2023 [cité le 20 avril 2024]. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html>
13. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004;430(6996):242-9.

14. OMS. The top 10 causes of death. [En ligne]. 7 avril 2024 [cité le 20 avril 2024]. Disponible sur : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death/>
15. Pialoux G, vih.org. « One Health », notion émergente. [En ligne]. 8 décembre 2022 [cité le 26 mai 2024]. Disponible sur : <https://vih.org/maladies-emergentes/20221208/one-health-notion-emergente/>
16. Santé Publique France. Coronavirus : chiffres clés et évolution de la COVID-19 en France et dans le Monde. [En ligne]. 28 juin 2023 [cité le 26 mai 2024]. Disponible sur : <https://www.santepubliquefrance.fr/dossiers/coronavirus-covid-19/coronavirus-chiffres-cles-et-evolution-de-la-covid-19-en-france-et-dans-le-monde/>
17. Institute of Medicine (US) Committee on Emerging Microbial Threats to Health in the 21st Century; Smolinski MS, Hamburg MA, Lederberg J, editors. Microbial Threats to Health: Emergence, Detection, and Response. Washington (DC) National Academies Press (US);2003.
18. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-3.
19. Franzen C. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal*. 2008;2:1-34.
20. Weiss LM, Becnel JJ. Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition. Wiley-blackwell, 2014. 709p.
21. Zander E. Krankheiten und Schädlinge der erwachsenen Bienen. *Anz Für Schädlingskunde*. 1 avr 1948;21(1):16-16.
22. Desportes-Livage I, Datry A. Infections à microsporidies, *Isospora* et *Sarcocystis*. *EMC - Maladies Infectieuses*. dec 2005;2(4):178-96.
23. Han B, Weiss LM. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens within the Fungal Kingdom. *Microbiol Spectr*. avr 2017;5(2):10.
24. Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, et al. Waterborne Outbreak of Intestinal Microsporidiosis in Persons with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Infect Dis*. dec 1999;180(6):2003-8.
25. Decraene V, Lebbad M, Botero-Kleiven S, et al. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol Infect*. mars 2012;140(3):519-27.
26. Desoubeaux G, Nourrisson C, Moniot M, Kyvon MAD, Bonnin V, Bretonniere MEDL, et al. Genotyping Approach for Potential Common Source of *Enterocytozoon bienersi* Infection in Hematology Unit. *Emerg Infect Dis*. sept 2019;25(9):1625-1631.

27. Bojko J, Reinke AW, Stentiford GD, Williams B, Rogers MSJ, Bass D. Microsporidia: a new taxonomic, evolutionary, and ecological synthesis. *Trends Parasitol.* 1 août 2022;38(8):642-59.
28. James TY, Pelin A, Bonen L, Ahrendt S, Sain D, Corradi N, et *al.* Shared Signatures of Parasitism and Phylogenomics Unite *Cryptomycota* and *Microsporidia*. *Curr Biol.* août 2013;23(16):1548-53.
29. Murareanu BM, Sukhdeo R, Qu R, Jiang J, Reinke AW. Generation of a microsporidia species attribute database and analysis of the extensive ecological and phenotypic diversity of microsporidia. *mBio.* 2021;12:e0149021.
30. Orhan N. St. John's Wort *Hypericum perforatum* Laboratory Guidance Document. Botanical Adulterants Prevention Program. 17 dec 2021.
31. Sumida M, Kato Y, Kurabayashi A. Sequencing and analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) and coding regions in the EcoR I fragment of the ribosomal DNA of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *Genes Genet Syst.* 2004;79(2):105-18.
32. Li W, Feng Y, Zhang L, Xiao L. Potential impacts of host specificity on zoonotic or interspecies transmission of *Enterocytozoon bieneusi*. *Infect Genet Evol.* nov 2019;75:104033.
33. Li W, Feng Y, Santin M. Host Specificity of *Enterocytozoon bieneusi* and Public Health Implications. *Trends Parasitol.* 1 juin 2019;35(6):436-51.
34. Breton J, Bart-Delabesse E, Biligui S, Carbone A, Seiller X, Okome-Nkoumou M, et *al.* New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. *J Clin Microbiol.* août 2007;45(8):2580-9.
35. Thellier M, Breton J. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite.* 1 sept 2008;15(3):349-58.
36. Robertson L, Clark C, Debenham J, Dubey J, Kváč M, Li J, et *al.* Are molecular tools clarifying or confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife? *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 1 août 2019;9:323-41.
37. Li W, Feng Y, Xiao L. *Enterocytozoon bieneusi*. *Trends Parasitol.* janv 2022;38(1):95-6.
38. Jaroenlak P, Cammer M, Davydov A, Sall J, Usmani M, Liang FX, et *al.* 3-Dimensional organization and dynamics of the microsporidian polar tube invasion machinery. *PLoS Pathog.* 18 sept 2020;16(9):e1008738.
39. Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroentérologie Clin Biol.* 1 sept 2010;34(8):450-64.
40. Franzen C. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol (Praha).* 1 janv 2013;52(1-2):36-40.

41. Frixione E, Ruiz L, Cerbón J, Undeen AH. Germination of *Nosema algerae* (*Microspora*) spores: conditional inhibition by D₂O, ethanol and Hg₂⁺ suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J Eukaryot Microbiol.* 1997;44(2):109-16.
42. Undeen AH, ElGazzar LM, Vander Meer RK, Narang S. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (*Microspora: Nosematidae*). *J Invertebr Pathol.* 1 janv 1987;50:230-7.
43. CDC. Microsporidiosis. [En ligne]. 29 mai 2019 [cité le 24 mars 2024]. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/index.html>
44. Ruan Y, Xu X, He Q, Li L, Guo J, Bao J, et al. The largest meta-analysis on the global prevalence of microsporidia in mammals, avian and water provides insights into the epidemic features of these ubiquitous pathogens. *Parasit Vectors.* 1 avr 2021;14(1):186.
45. Yu M, Liu X, Karim F, Xie M, Wu J, Li D, et al. Prevalence and new genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in wild rhesus macaque (*Macaca mulatta*) in China: A zoonotic concern. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 19 avr 2022;18:61-7.
46. Sinpoo C, Disayathanoowat T, Williams PH, Chantawannakul P. Prevalence of infection by the microsporidian *Nosema spp.* in native bumblebees (*Bombus spp.*) in northern Thailand. *PLoS ONE.* 7 mars 2019;14(3):e0213171.
47. Ramanan P, Pritt BS. Extraintestinal Microsporidiosis. *J Clin Microbiol.* nov 2014;52(11):3839-44.
48. Keeling P. Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathog.* 25 sept 2009;5(9):e1000489.
49. Freeman MA, Yokoyama H, Osada A, Yoshida T, Yamanobe A, Ogawa K. *Spraguea* (*Microsporida: Spraguidae*) infections in the nervous system of the Japanese anglerfish, *Lophius litulon* (Jordan), with comments on transmission routes and host pathology. *J Fish Dis.* 2011;34(6):445-52.
50. Wasson K, Peper RL. Mammalian Microsporidiosis. *Veterinary Pathology.* 2000;37(2):113-128.
51. Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis.* oct 2006;19(5):485.
52. Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* juill 2005;18(3):423-45.
53. Nourrisson C, Hamane S, Bonhomme J, Durieux MF, Foulquier JB, Lesthelle S, et al. Case series of intestinal microsporidiosis in non-HIV patients caused by *Encephalitozoon hellem*. *Emerg Microbes Infect.* 8 déc 2023;12(2):2258997.

54. Weber R, Deplazes P, Schwartz D. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol.* 2000;6:166-92.
55. Kotler DP, Orenstein JM. Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol.* nov 1994;89(11):1998-2002.
56. Ripert C, Pajot FX, Vincendeau P, Esquerdo Gomez F. Épidémiologie des maladies parasitaires. Cachan : Éd. Médicales Internat, 1996. 393p.
57. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev.* oct 1994;7(4):426-61.
58. Kelkar R, Sastry PS, Kulkarni SS, Saikia TK, Parikh PM, Advani SH. Pulmonary microsporidial infection in a patient with CML undergoing allogeneic marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* janv 1997;19(2):179-82.
59. Sandfort J, Hannemann A, Gelderblom H, Stark K, Owen RL, Ruf B. *Enterocytozoon bieneusi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* sept 1994;19(3):514-6.
60. Katzwinkel-Wladarsch S, Lieb M, Heise W, Löscher T, Rinder H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop Med Int Health.* 1996;1(3):373-8.
61. ePOPI. Microsporidiose. [En ligne]. 15 août 2022 [cité le 27 septembre 2024]. Disponible sur : https://epopi.fr/?page=fiche&id=872&cat_id=1386&tk=66730d82444338dfb7cc51de52338866#traitement&tk=66730d82444338dfb7cc51de52338866
62. Zeman DH, Baskin GB. Encephalitozoonosis in Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol.* 1 janv 1985;22(1):24-31.
63. Didier ES, Varner PW, Didier PJ, Aldras AM, Millichamp NJ, Murphey-Corb M, et al. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol (Praha).* 1994;41(1):1-11.
64. Mansfield KG, Carville A, Hebert D, Chalifoux L, Shvetz D, Lin KC, et al. Localization of Persistent *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Normal Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) to the Hepatobiliary Tree. *J Clin Microbiol.* août 1998;36(8):2336-8.
65. Mansfield KG, Carville A, Shvetz D, MacKey J, Tzipori S, Lackner AA. Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepatobiliary disease. *Am J Pathol.* avr 1997;150(4):1395-405.

66. Tzipori S, Carville A, Widmer G, Kotler D, Mansfield K, Lackner A. Transmission and establishment of a persistent infection of *Enterocytozoon bieneusi*, derived from a human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Infect Dis.* avr 1997;175(4):1016-20.
67. L. V. Chalifoux, J. MacKey, A. Carville, D. Shvetz, K. C. Lin, A. Lackner, and K. G. Mansfield. Ultrastructural Morphology of *Enterocytozoon bieneusi* in Biliary Epithelium of Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *Veterinary Pathology.* 1998;(35):4, 292-296.
68. Slodkowicz-Kowalska A, Graczyk TK, Tamang L, Girouard AS, Majewska AC. Asymptomatic *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in captive mammals. *Parasitol Res.* févr 2007;100(3):505-9.
69. Graczyk TK, Bosco-Nizeyi J, da Silva AJ, Moura INS, Pieniazek NJ, Cranfield MR, et al. A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitol Res.* oct 2002;88(10):926-31.
70. Sak B, Petrželková KJ, Květoňová D, Mynářová A, Pomajbíková K, Modrý D, et al. Diversity of *Microsporidia*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in Mountain Gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. *PLoS ONE.* 11 nov 2014;9(11):e109751.
71. Sak B, Petrzelkova KJ, Kvetonova D, Mynarova A, Shutt KA, Pomajbikova K, et al. Long-Term Monitoring of *Microsporidia*, *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at Different Stages of Habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS ONE.* 7 août 2013;8(8):e71840.
72. Butel C, Mundeke SA, Drakulovski P, Krasteva D, Ngole EM, Mallié M, et al. Assessment of Infections with *Microsporidia* and *Cryptosporidium spp.* in Fecal Samples from Wild Primate Populations from Cameroon and Democratic Republic of Congo. *Int J Primatol.* 1 avr 2015;36(2):227-43.
73. Sak B, Kváč M, Petrželková K, Květoňová D, Pomajbíková K, Mulama M, et al. Diversity of microsporidia (*Fungi: Microsporidia*) among captive great apes in European zoos and African sanctuaries: evidence for zoonotic transmission? *Folia Parasitol (Praha).* 1 juin 2011;58(2):81-6.
74. Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerg Infect Dis.* 1998;4(2):149-58.
75. Butynski TM, Kalina J. Three new mountain national parks for Uganda. *Oryx.* oct 1993;27(4):214-24.
76. Moreira G, Cruz AVS, Santos-Silva S, Moreira RSS, Mesquita JR. Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in Non-Human Primates in Portuguese Zoos. *Anim Open Access J MDPI.* 25 juin 2024;14(13):1874.

77. Karim MR, Dong H, Li T, Yu F, Li D, Zhang L, et al. Predomination and New Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in Captive Nonhuman Primates in Zoos in China: High Genetic Diversity and Zoonotic Significance. PLOS ONE. 23 févr 2015;10(2):e0117991.
78. Ye J, Xiao L, Ma J, Guo M, Liu L, Feng Y. Anthroponotic Enteric Parasites in Monkeys in Public Park, China. Emerg Infect Dis. oct 2012;18(10):1640-3.
79. Yu F, Wu Y, Li T, Cao J, Wang J, Hu S, et al. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* zoonotic genotype D in captive golden snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellanae*) in zoos in China. BMC Vet Res. 5 juin 2017;13:158.
80. Lecointre G, Le Guyader H. Classification phylogénétique du vivant - Tome 1 - 4e édition. Éditeur Belin, 2016. 584p.
81. *Encyclopedia Britannica*. Napier JR, Groves CP. Primate. [En ligne]. 1 septembre 2024 [cité le 3 septembre 2024]. Disponible sur : <https://www.britannica.com/animal/primate-mammal>.
82. Universalis E. Encyclopædia Universalis, Deputte B. PRIMATES [En ligne]. 2008 [cité le 30 juin 2024]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopédie/primates/>
83. Neysa Grider-Potter. (2016, Mar 03). Our Primate Heritage. [En ligne]. 3 mars 2016 [cité le 30 juin 2024]. Disponible sur : <https://askananthropologist.asu.edu/stories/our-primate-heritage>
84. Geissmann T. Taxonomy and Evolution of Gibbons. Evol Anthropol. 7 janv 2003;11:28-31.
85. The Conversation, Desoubreaux G. Maladies émergentes : Le projet MicroMonkey traque la microsporidiose chez les grands singes d'Afrique. [En ligne]. 17 mars 2022 [cité le 22 novembre 2023]. Disponible sur : <http://theconversation.com/maladies-emergentes-le-projet-micromonkey-traque-la-microsporidiose-chez-les-grands-singes-dafrique-179264>
86. Qiagen. QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit - Stool/Gut DNA Isolation. [En ligne]. [cité 17 sept 2024]. Disponible sur : <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-powerfecal-pro-dna-kit>
87. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. déc 2013;30(12):2725-9.
88. EMBL-EBI. Clustal Omega. [En ligne]. 2024 [cité le 17 septembre 2024]. Disponible sur : <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>
89. Santín M, Fayer R. *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. J Eukaryot Microbiol. 2009;56(1):34-8.

ANNEXE 1 – ESPECES DES MICROSPORIDIOSES HUMAINES

Tableau 1. Espèces responsables de microsporidioses chez l'Homme.

Source: Han B, Weiss LM. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens within the Fungal Kinadom. *Microbiol Spectr*.

Species	Synonym(s)	Common sites of infection in humans	Other mammalian hosts	Reported Non-mammalian hosts	Disease Manifestations Reported
<i>Anncaliia algerae</i>	<i>Brachiola algerae</i> <i>Nosema algerae</i>	Eye Muscle		Mosquitoes	myositis, keratoconjunctivitis, cellulitis
<i>Anncaliia connori</i>	<i>Brachiola connori</i> <i>Nosema connori</i>	Systemic			disseminated disease
<i>Anncaliia vesicularum</i>	<i>Brachiola vesicularum</i>	Muscle			myositis
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	<i>Nosema cuniculi</i>	Systemic	Wide host range	Birds	hepatitis, encephalitis, peritonitis, urethritis, prostatitis, nephritis, sinusitis, keratoconjunctivitis, cystitis, diarrhea, disseminated infection
<i>Encephalitozoon hellem</i>		Eyes	Bats	Birds	superficial keratoconjunctivitis, sinusitis, pneumonitis, nephritis, protatitis, urethritis, cystitis, diarrhea, disseminated infection
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	<i>Septata intestinalis</i>	Small intestine	Wide host range	Geese	diarrhea, intestinal perforation,, cholangitis, nephritis, superficial keratoconjunctivitis, disseminated infection
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>		Small intestine Biliary tract	Wide host range	Birds	diarrhea, malabsorption with wasting syndrome, cholangitis, rhinitis, bronchitis
<i>Microsporidium africanum</i>		Eyes			stromal keratitis
<i>Microsporidium ceylonensis</i>		Eyes			stromal keratitis
<i>Microsporium CU (Endoreticulatus-like)</i>		Muscle			myositis
<i>Nosema oculorum</i>		Eyes			stromal keratitis
<i>Pleistophora ronneafiei</i>		Muscle		Fish *	myositis
<i>Trachipleistophora anthropoptera</i>		Eyes Systemic		Insects *	encephalitis, keratitis, disseminated infection
<i>Trachipleistophora hominis</i>		Eyes Muscle		Mosquitoes *	myositis, keratoconjunctivitis, sinusitis, encephalitis
<i>Tubulinosema acridophagus</i>		Muscle Systemic		Fruit fly *	myositis, disseminated infection
<i>Vittaforma corneae</i>	<i>Nosema corneum</i>	Eyes Urinary tract			Keratoconjunctivitis, urinary tract infection

* Putative host(s) based on phylogeny or host relationships of other species within the genus

ANNEXE 2 – PROTOCOLE DETAILLE DE L'EXTRACTION ADN

Matériel utilisé

- Cônes à filtres de 1000 µL + pipette adaptée
- Cônes à filtres de 200 µL + pipette adaptée
- Cônes à filtres de 10 µL + pipette adaptée
- Centrifugeuse
- Petite centrifugeuse de paillasse (sous le PSM)
- PSM
- Portoirs tubes

Réactifs utilisés

- Kit d'extraction Qiagen PowerFecal Pro DNA®
- *Universal Inhibition Control DIA-UIC (Cy5)-050 Cont DNA 4x10*3* (contrôle interne d'amplification, stocké dans le congélateur -20°C, réf : DICU-CY-L100)

Étape pré-analytique

- Allumer les UV sous le PSM pendant 15 min.
- Sortir les réactifs du coffret et une colonne par échantillon.
- Solution CD2 stockée à 2°-8°C
- Autres réactifs stockés à température ambiante.

Étape d'extraction de l'ADN

1. Vortexer brièvement le tube PowerBead Pro vide.
2. Ajouter jusqu'à 250 mg d'échantillon de selle et 800 µL de solution CD1.
3. Homogénéiser le mélange selon le programme prédéfini :
 - Homogénéisation 2000 rpm, 30 secondes
 - Pause 30 secondes
 - Homogénéisation 2000 rpm, 30 secondes.
4. Centrifuger les tubes d'échantillon à vitesse 15.000 g pendant 1 minute à température ambiante.
5. Transférer le surnageant (500-600 µL) dans un tube de microcentrifugation vide de 2 mL, préalablement identifié. Ajouter 200 µL de solution CD2 et vortexer pendant 5 secondes.
6. Centrifuger les tubes d'échantillon à vitesse 15.000 g pendant 1 minute à température ambiante.

7. Transférer le surnageant (700 µL maximum) dans un tube de microcentrifugation vide de 2 mL, préalablement identifié. Ajouter 600 µL de solution CD3 au lysat et vortexer pendant 5 secondes.
8. Déposer 650 µL du lysat obtenu dans une colonne MB Spin et centrifuger pendant 1 minute à vitesse 15.000 g.
9. Jeter l'écoulement et centrifuger une nouvelle fois pendant 1 minute à vitesse 15.000 g pour s'assurer que tout le lysat est passé dans la colonne d'écoulement.
10. Placer la colonne MB Spin dans un tube collecteur de 2 mL et identifié sur le capuchon :
 - Ajouter 500 µL de solution EA dans la colonne.
 - Fermer le capuchon et centrifuger 1 minute à vitesse 15.000 g
 - Jeter l'effluent
11. Replacer la colonne MB Spin dans le même tube collecteur de 2 mL
 - Ajouter 500 µL de solution C5 dans la colonne.
 - Fermer le capuchon et centrifuger 1 minute à vitesse 15.000 g
 - Jeter l'effluent
12. Réaliser une seconde centrifugation, avec un nouveau tube collecteur, pendant 2 minutes à une vitesse 16.000 g.
13. Placer la colonne MB Spin dans un tube à élution 1,5 mL, préalablement identifié.
 - Ajouter 50-100 µL de solution C6 au centre de la membrane filtrante blanche.
 - Centrifuger pendant 1 minute à vitesse 15.000 g.
 - Jeter la colonne MB Spin
14. Ajouter 2 µL d'Universal Inhibition Control DIA-UIC (Cy5)-050 Cont DNA 4x10³, directement à l'extrait d'ADN.

Remarque : l'échantillon peut être conservé à -20°C.

ANNEXE 3 – PROTOCOLE DETAILLE DE L'AMPLIFICATION ADN

Matériel et réactifs

- Platinum qPCR Supermix-UDG
- Sonde EbS2 d'*Enterocytozoon*
- Amorce Eb1 et Eb5 d'*Enterocytozoon*
- Amorce FEI1, REI1 d'*Encephalitozoon*
- Sonde d'*Encephalitozoon*
- Eau stérile
- Témoins positifs (extraits d'ADN d'*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*)
- Contrôle d'inhibition *Probes and primers* (mélange de sonde et amorces spécifiques de l'ADN de plasmide).

Préparation du Mix *Enterocytozoon* / *Encephalitozoon*

Préparer le volume de mélange réactionnel nécessaire au nombre de puits (n).

$$n = \text{Nombre de patient(s) à tester} \times 2 + 2 \text{ témoins positifs} \times 2 + 1 \text{ témoin négatif} + 2 \text{ puits virtuels}$$

Nombre de patients		1	2	3	4	5	6	7
Nombre de cupules	1 (volume en µL)	9	11	13	15	17	19	21
Platinum qPCR SuperMix-UDG	12,5	112,5	137,5	162,5	187,5	212,5	237,5	262,5
Amorce Eb1 10µM <i>Enterocytozoon</i>	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
Amorce Eb5 10µM <i>Enterocytozoon</i>	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
Sonde EbS2 10µM <i>Enterocytozoon</i>	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
Amorce REI1 10µM <i>Encephalitozoon</i>	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
Amorce FEI1 10µM <i>Encephalitozoon</i>	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
Sonde 10µM <i>Encephalitozoon</i>	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
Univ Inhibition Control	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
MgCl ₂	0,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5
Eau	3.5	31.5	38.5	45.5	52.5	59.5	66.5	73.5
DNA/tube	5	5	5	5	5	5	5	5
Volume final/tube	25	25	25	25	25	25	25	25

Préparation de la plaque 96 puits

Pour les patients à tester :

- Déposer 20 µL de mix *Enterocytozoon* / *Encephalitozoon* dans les cupules en fonction de la microsporidie à amplifier
- Déposer 5 µL d'ADN extrait

Remarque : si la plaque ne se prépare pas le même jour que l'extraction, les extraits sont stockés dans le congélateur -20°C.

Pour les témoins positifs :

- Déposer 20 µL de mix dans chaque cupule
- Déposer 2,5 µL d'ADN
- Déposer 2,5 µL d'eau stérile

Pour le témoin négatif :

- Déposer 20 µL de mix
- Déposer 5 µL d'eau stérile
- Filmer la plaque à l'aide d'un adhésif transparent de protection et apporter la plaque au LightCycler II 480®.
- Centrifuger la plaque pendant 1 minute 30 à 2000 rpm puis l'insérer dans le LightCycler II 480®.
- Sélection du programme LightCycler 480 Software. Dans « New experiment from template » : sélection de l'intitulé « PCRq Multiplex – Crypto - Microsporidies »

Programme	Nombre de cycles	Température	Durée
Décontamination		50°C	2 min
Dénaturation initiale		95°C	10 min
Dénaturation	50	95°C	15 sec
Élongation		60°C	1 min

- Rentrer l'identité des échantillons (nom du patient ou numéro de travail) dans l'onglet « sample editor », après avoir ou non sélectionné les puits dans « Subset »
- Plus cliquer sur « Start Run »

Résultats

- Une fois les cycles terminés, la boîte de dialogue « Save Experiment » s'affiche.
- Le module « Analysis » est alors accessible, cliquer dessus. Il faut faire l'analyse sur le canal CY5 (témoin interne 618-660), le canal FAM (détection d'ADN d'*Enterocytozoon* 465-510), le canal HEX (détection d'ADN d'*Encephalitozoon* 533-580), le canal TxRed (détection d'ADN de *Cryptosporidium* 533-610)
- Dans la page Create new Analysis, sélectionner « Abs Quant/2nd derivative max »
- Une nouvelle boîte de dialogue s'ouvre, sélectionner :
 - « Analysis Type » : « Abs Quant/2nd derivative max »
 - « Subset » : « All samples » ou le plan de plaque indiqué
 - « Program » : « Amplification »
 - « Name » : « Abs Quant/2nd derivative max for all samples»
 - Cliquer sur "Accept", dans Filter Combs 618-660, sélectionner le premier filtre « Cy5 » puis « Calculate » et enfin « Save »
(Remarque : faire la même chose pour les filtres FAM, HEX, TxRed)
- Aller dans l'onglet « Report », dans « General » cochez :
 - « Experiment »
 - « Protocol »
 - « Revision history »
 - « Setting »
 - « Results »
 - « Amplification Curves »
- Cliquer sur « Generate » puis sur « PDF » pour enregistrer dans « Mes documents/ parasitologie/ Microsporidie »

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Arthur Wilhelm

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N   tudiant : 22114615

N  Thèse : 73

Nom et Prénom : WILHELM Arthur

Sujet : Profil épidémiologique et potentiel zoonotique des microsporidies
chez les grands singes africains au travers de microMONKEY et
dans la démarche du concept « One Health »

Tours, le : 27/09/2024

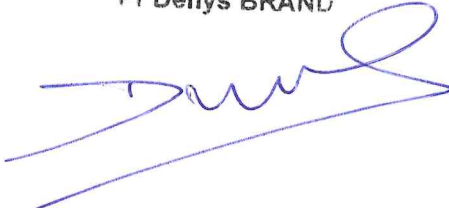
Le(s) Directeur(s) de Thèse :
Nom(s) et signature(s)


Pr Guillaume DESOUBEAUX
PU-PH

**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



NOM, PRÉNOM de l'étudiant	WILHELM Arthur	N° 73
TITRE DE LA THÈSE Profil épidémiologique et potentiel zoonotique des microsporidies chez les grands singes africains au travers de l'étude microMONKEY et dans la démarche du concept « One Health »		
RÉSUMÉ DE LA THÈSE Les microsporidies sont des eucaryotes parasites intracellulaires obligatoires et opportunistes, responsables de symptomatologies digestives, dans la plupart des cas chez le patient immunodéprimé. Retrouvées dans l'environnement sous forme de spores infestantes, il existe une multitude d'espèces différentes, dont quatorze sont des pathogènes de l'Homme. Bien qu'<i>Enterocytozoon bieneusi</i> et le genre <i>Encephalitozoon</i> soient le plus souvent incriminés en pathologie humaine, ils sont également très répandus dans l'environnement et chez les animaux à travers le globe. Insectes, oiseaux, poissons, rongeurs et autres mammifères présentent un portage de microsporidies non négligeable, même en l'absence de symptômes. Pouvant être ainsi transmises par contact direct ou indirect avec des animaux infestés, les microsporidies sont liées à une transmission zoonotique et interindividuelle. La proximité grandissante des animaux avec l'Homme, par le biais de l'élevage intensif, de la déforestation, de l'urbanisation croissante et des déplacements individuels et commerciaux, est un facteur de risque établi qui ne cesse de s'accroître avec la mondialisation. Les grands singes africains retrouvés dans des réserves naturelles, à l'état sauvage ou dans des parcs zoologiques européens, sont de plus en plus confrontés à l'activité humaine. Ce rapprochement géographique exprime donc un risque de transmission des microsporidies pour les individus en contact avec eux. Afin d'étudier cet aspect épidémiologique de la microsporidiose, l'étude microMONKEY évalue la prévalence du portage des microsporidies chez certaines populations de grands singes en Afrique et dans des zoos européens. Déterminer la prévalence d'<i>Enterocytozoon bieneusi</i> et d'<i>Encephalitozoon intestinalis</i> chez ces mammifères par PCR quantitative et identifier les souches communes par génotypage MLST des régions ITS, de microsatellites et de minisatellites de l'ADN permettrait d'établir un profil épidémiologique de la répartition de ces pathogènes au sein de populations simiennes bien précises. Par la suite, l'étude de leurs microbiotes intestinaux et la comparaison à d'autres souches retrouvées chez l'Homme permettrait de savoir s'il existe une corrélation et une transmission inter-espèces des microsporidies.		
MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY <i>Enterocytozoon bieneusi</i>, <i>Encephalitozoon intestinalis</i>, génotypage MLST, grands singes africains, microMONKEY, microsporidies, microsporidiose, One Health		
<u>JURY</u> PRÉSIDENT : Pr. Denys BRAND, doyen et enseignant-chercheur, UFR des Sciences pharmaceutiques de Tours DIRECTEUR : Pr. Guillaume DESOUBEAUX, PU-PH au laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Tours Enseignant-chercheur à l'UFR de Médecine de Tours Unité Inserm U 1100 – Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires (CEPR) MEMBRES : Dr. Adélaïde CHESNAY, MCU-PH au laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Tours Enseignant-chercheur à l'UFR des Sciences pharmaceutiques de Tours Unité Inserm U 1100 – Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires (CEPR) Dr. Antoine LECLERC, vétérinaire à la clinique du ZooParc de Beauval, Saint-Aignan-sur-Cher		
DATE ET LIEU DE SOUTENANCE	16 octobre 2024, UFR des Sciences Pharmaceutiques de Tours	