

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Etude Bibliographique et Contribution à l'Identification
d'*Encephalitozoon cuniculi* chez quelques cadavres de lapins dans la
région d'Alger (I.T.E.L.V.)**

Présenté par : GHRIB Nour El Houda

Soutenu le : 02/07/2017

Devant le jury composé de:

- Président :	HARHOURA Khaled	Maitre de conférences –classe A	ENSV
- Promoteur :	AISSI Miriem	Professeur	ENSV
	ABBAD Hayat	Docteur Vétérinaire	ITELV
- Examineur 1 :	BENALI Nadia	Maitre-assistant –classe A	ENSV
- Examineur 2 :	ZENIA Safia	Maitre-assistant –classe A	ENSV

Remerciement

Après avoir rendu grâce à Dieux le tout puissant et le Miséricordieux ;

Je tiens à remercier sincèrement tous ceux –de près ou de loin- sans qui la réalisation de ce Projet de Fin d'Etude n'aurait pas abouti, mais plus particulièrement :

Pr. Aqss Meriem mon Encadreuse pour sa disponibilité, ses conseils et son sens d'écoute et d'échange.

Dr. ABBA Hayat ma Co promotrice pour son travail rigoureux ses efforts et son assistance permanente.

Je souhaiterais également témoigner ma gratitude à Dr. HARROURA, Dr. DJRDOUR, Dr. JAAB, Dr. ZENAT, Dr. BENATF et Pr. ABDFFAF pour leur soutien et leur aide indispensable.

Mes amis, mes collègues et surtout mes camarades du groupe 06 avec qui j'ai partagé d'inoubliables moments.

Enfin, Ma petite famille GHRB, papa, maman, Housseem, Wissame, Dayaa, Ubtihal, ma tante Fouzia. K. Fadia. M. Rayan et Mehdi. N qui ont toujours été présent et à qui je dois qui je suis aujourd'hui.

Sans oublier mes âmes sœurs KH et B.D qui ont fait le parcours avec moi et qui ne se sont jamais lassés de m'encourager.

Liste des figures

- Figure 01.** Droite : Répartitions des lapins séropositifs en fonction de leur âge; Gauche : Répartitions des lapins séropositifs en fonction de la symptomatologie. (p48)
- Image 01.** Lapin présentant un torticollis (A), Uvéite phacoclastique chez un lapin (B), Lapin d'un mois souffrant d'une paralysie des membres postérieurs due à *E. cuniculi* (C). (p15)
- Image 02.** Encephalitozoonose. Périvasculite « Cuffing », Encéphalite non purulente due à *E.cuniculi*. Microphotographie. Ziehl-Neelsen. (p17)
- Image 03.** Encephalitozoonose. Amas de microsporidies au centre d'un granulome encéphalique. Microphotographie. May Grunwald-Giemsa. (p18)
- Image 04.** Encephalitozoonose. Granulome cérébral avec nécrose centrale. Microphotographie. (p18)
- Image 05.** Encephalitozoonose. Microgranulome épithéloïde. (p18)
- Image 06.** Vacuole parasitophore dans une culture cellulaire en lumière blanche.(A), Même vacuole mise en contact avec un sérum positif (B). (p22)
- Photo 01.** Elevage en cage des lapins. (p28)
- Photo 02.** Confection d'un frottis urinaire. (p29)
- Photo 03.** Matériel de base d'une autopsie. (p30)
- Photo 04.** Découpage des prélèvements après un bain au Formol ; Alcool à différentes concentrations. (p32)
- Photo 05.** Retrait des cassettes après un séjour en paraffine liquide. (p33)
- Photo 06.** Disposition des prélèvements dans les moules. (p33)
- Photo 07.** Automate d'inclusion de paraffine. (p34)
- Photo 08.** Ecoulement de paraffine liquide sur les blocs en moules. (p34)
- Photo 09.** Appareil de refroidissement ; Refroidissement des blocs de paraffine et découpage. (p34)

Photo 10. Microtome ; Réglage de l'épaisseur du ruban de paraffine ; Roulement du ruban de paraffine. (p35)

Photo 11. Confection des lames ; Séchage des lames. (p36)

Photo 12. Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un cerveau de lapin (sujet N°1) au grossissement x40 ; Droite : Coloration avec Hemalun Eosine, spores colorées en Rose-Violet ; Gauche : Coloration avec Trichrome de Masson, spores colorées en Violet) (p41)

Photo 13. Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un cerveau de lapin (sujet N°1) au grossissement x100 ; Coloration avec Trichrome de Masson, spores colorées en Violets. (p43)

Photo 14. Vue en Microscopie optique d'une coupe Histologique d'un foie de lapin (sujet N°2) ; Coloration avec Trichrome de Masson, spores colorées en Violets ; Droite : grossissement x40 ; Gauche : grossissement x100. (p44)

Photo 15. Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un foie de lapin (sujet N°3) au grossissement x100 ; coloration au Trichrome de Masson, sores colorées en Violets. (p44)

Photo 16. Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un foie de lapin (sujet N°8) au grossissement x100 ; coloration au Trichrome de Masson, sores colorées en Violets. (p45)

Photo 17. Vue en microscopie optique d'un frottis urinaire avec coloration au May Grünwald Giemsa, spores colorées en Bleu Brillant. (p45)

Schéma01. Représentation Tridimensionnelle d'une spore au microscope électronique (A) ; Représentation d'une spore d'*E.intestinalis* en section transversale au microscope électronique à transmission. (B). (p5)

Schéma02. Représentations d'une spore au microscope électronique démontrant les organites internes du parasite. (p7)

Schéma03. Figure explicative de la phase d'infection avec les étapes d'extrusion du filament tubulaire. (p9)

Schéma 04. Cycle de vie général d'une microsporidie. (p9)

Tableau I. Classification des espèces du phylum des Microspora qui infectent l'homme. (p3)

Tableau II. Diagnostic différentiel histologique des affections Dues à *E.cuniculi* et *Toxoplasma gondii*. (p6)

Tableau III. Diagnostic différentiel histologique des affections Dues à <i>E.cuniculi</i> et <i>Toxoplasma gondii</i> .	(p7)
Tableau IV. Diagnostic différentiel histologique des affections Dues à <i>E.cuniculi</i> et <i>Toxoplasma gondii</i> .	(p7)
Tableau V. Prévalence des infections à <i>E. cuniculi</i> chez le lapin déterminé par la sérologie.	(p11)
Tableau VI. Nombre de lapins du groupe 1 avec différents symptômes indicatifs de l'encephalitozoonose.	(p16)
Tableau VII. Réactifs destinés à la préparation des coupes histologique.	(p37)
Tableau VIII. Résultats des différentes colorations utilisées.	(p40)
Tableau IX. Tableau Récapitulatif des Lésions observés.	(p42)

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CD8+/ CD4+ : Cluster de Différentiation

CIA : CarbonImmunoAssay

DO : Densité Optique

E.cuniculi : *Encephalitozooncuniculi*.

ELISA :Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay

GALT : Gut AssociatedLymphoid Tissue

IFAT : ImmunoFluorescenceAntibody Test

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

IL12/ IL2/ IL10 : InerLeukine

INF : Interféron

ITELV : Institut Technique des Elevages

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

LT : Lymphocyte T

NAC : Nouveaux Animaux de Compagnie

ONAB : Office Nationale de l'Alimentation du Bétail

PCR : Polymerase Chain Reaction

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

SNC : Système Nerveux Centrale

UV : Ultras Violets

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Tables des Matières

INTRODUCTION	1
<u>Première partie: Etude Bibliographique</u>	
I. LE PARASITE: ENCEPHALITOZOON CUNICULI	2
I.1. Historique	2
I.2. Classification	2
1.2.1 Phylum des Microspora	2
1.2.2. Souches et Caryotypes d'E.cuniculi	3
I.3. Morphologie	4
I.3.1. En microscopie optique	5
1.3.1.1. Parasite à l'état frais	5
1.3.1.2. Parasite avec coloration	6
1.3.2. En microscopie électronique	7
II. CYCLE	
PARASITAIRE	8
II.1. Phase d'Infection	8
II.2. Phase de Prolifération	
II.3. Phase de Différentiation	8
III. L'ENCEPHALITOZOONOSE DU LAPIN	10
III.1. Epidémiologie	10
III.1.1. Epidémiologie Descriptive	10
III.1.1.1. La prévalence	10
III.1.1.2. Importance économique	10
III.1.2. Epidémiologie analytique	12
III.1.2.1. Source du parasite	12
III.1.2.2. Mode d'infection	12
III.1.2.3. Prédispositions	12
III.1.3. Epidémiologie synthétique	13
IV. SYMPTÔMES	13
IV.1. Symptômes nerveux	14
IV.2. Symptômes rénaux	14
IV.3. Symptômes ophtalmologiques	14
IV.4. Autres symptômes	15
V. LESIONS	15
V.1. Macroscopiquement	15
V.2. Histologiquement	16
V.2.1. Descriptions des lésions	16
V.2.1.1. Système nerveux	17
V.2.1.2. Rénales	18
V.2.1.3. Oculaires	19
V.2.1.4. Autres lésions	19
VI. IMMUNITE	19
VI.1. Interactions hôte-parasite	19
VI.2. Intervention de l'immunité à médiation cellulaire	20
VI.3. Intervention de l'immunité à médiation humorale	21
VII. DIAGNOSTIC	21

VII.1. Ante-mortem	21
VII.1.1. Le diagnostic de confirmation	21
VII.1.1.1. Sérologie	21
VII.1.1.2. Recherche des spores dans les liquides corporels	23
VII.1.1.3. Biologie moléculaire	24
VII.1.2. Le diagnostic complémentaire	24
VII.2. Post-mortem	24
CONCLUSION	25
<u>Deuxième partie: Etude Expérimentale</u>	
INTRODUCTION	26
I. OBJECTIFS	26
II. MATERIEL ET METHODES	26
II.1. Lieu des prélèvements	26
II.2. Recueil des commémoratifs	27
II.3. Nature des prélèvements	28
II.3.1. Frottis urinaires	29
II.3.2. Autopsies	30
II.4. Réalisations et conservation des prélèvements	30
II.5. Réalisation des lames Histologiques	31
II.6. Protocoles de coloration	36
II.6.1. Coloration topographique Hemalun Eosine	36
II.6.2. Trichrome de MASSON	37
II.6.3. Coloration au May Grünwald Giemsa	38
III. RESULTATS	40
III.1. Analyse des résultats par comparaison des différentes colorations	40
III.2. Analyse des résultats par comparaison entre différents lapins	42
IV. DISCUSSION	46
IV.1. Etude histo-pathologique des chercheurs et résultats obtenus	46
IV.2. Etude sérologique des chercheurs et résultats obtenus	48
IV.3. Choix de notre technique histo-pathologique et nos résultats	48
CONCLUSION	50
BIBLIOGRAPHIE	
RESUMES	

Le Vétérinaire Praticien dans sa vie professionnelle peut parfois rencontrer un hors du commun. En effet, de nouvelles orientations émergent en matière d'élevage concernant les petits animaux comme le lapin, ou même en Europe. Des vétérinaires qui se spécialisent dans les Nouveaux Animaux de Compagnie (NAC), ce qui entraîne la nécessité de s'intéresser à ces animaux et surtout le lapin qui est une espèce marginalisée.

L'Encephalitozoonose a été identifiée la toute première fois en 1922 sur des Lapins de Laboratoire atteint de paralysie (**WRIGHT** et **CRAIGHEAD**). Depuis ce temps, plusieurs études ont été faites sur l'infection par *Encephalitozoon cuniculi* sur les lapins et les humains où le parasite cause des infections opportunistes sur des patients atteints du (VIH). (**PETRI, 1969 ; SHADDUCK et PAKES, 1971**)

En pratique, *Encephalitozoon cuniculi* est une Microsporidie qui cause des troubles Neurologiques fonctionnels le plus souvent. Cependant, un diagnostic définitif du vivant de l'animal est difficile et les protocoles de traitement sont non uniformes, puisque seulement quelques études contrôlées ont été réalisées afin de fournir des options thérapeutiques à usage efficace pour les animaux malades. (**SUTER et al, 2001**)

Dans notre humble travail, nous allons parcourir en bibliographie les études effectuées sur le parasite *Encephalitozoon cuniculi*, qui atteint non seulement les lapins mais aussi l'homme et d'innombrables espèces, tout en prêtant une attention particulière sur la symptomatologie de la maladie, son impact sur les élevages mais aussi les moyens de diagnostics.

Nous présenterons également notre travail de recherche sur le diagnostic *post-mortem* (Histo-pathologique) pour la mise en évidence des lésions associées à l'Encephalitozoon et identification des spores.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE PARASITE : *ENCEPHALITOZOON CUNICULI*

I.1. Historique :

Les microsporidies sont des parasites des vertébrés, intracellulaires obligatoires de structure unicellulaire. Parmi eux le genre « *Encephalitozoon* » qui regroupe 3 espèces : *hellem*, *intestinalis* et *cuniculi*. *E. cuniculi* comme son nom l'indique affecte essentiellement le lapin et il est probablement le mieux connu des microsporidies. La première description du parasite et la suggestion qu'il était une microsporidie ont été faites en 1923 par LEVADITI et al.

Même si l'organisme a déjà été connu comme cause d'encéphalite et de néphrite chez le lapin de laboratoire, sa vraie nature a finalement été confirmée en 1962 (NELSON). Plus tôt, L'Encephalitozoonose a été rapportée pour des lapins de laboratoire comme paralysie (WRIGHT et CRAIGHEAD, 1922).

Précédemment le parasite était parfois groupé et confondu avec *Toxoplasma*. De nombreuses appellations lui ont été attribuées, on cite « *Nosema cuniculi* » (LAINSON et al., 1964, WEISER. 1964) dont le nom de la maladie Nosematose.

E. cuniculi est reconnu comme agent pathogène latent des animaux de laboratoire, il a été peu étudié les 50 premières années de sa découverte. Puis à cause de son interférence avec un grand nombre d'expériences et recherches (PETRI, 1969 ; SHADDUCK et PAKES, 1971) concernant la poliomyélite et les néoplasies et sa description chez les humains immunodéprimés notamment atteints du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), les études sur le parasite se sont multipliées. Son séquençage complet a été achevé qu'en 2001.

I.2. Classification :

I.2.1. Phylum des *Microspora* :

Le phylum des *Microspora* a été découvert dans les années 1800. Le 1^{er} cas humain fut décrit en 1959 chez un enfant Japonais. L'augmentation des cas de microsporidioses est associée à l'arrivée et la répartition du VIH. Ces maladies sont donc principalement constatées chez des patients atteints de VIH et/ou immuno-compromis (transplantation d'organes). Néanmoins trois espèces de *Nosema* et une (01) de *Brachiola* ont été documentées chez des patients immunocompétents. Les microsporidioses sont considérées comme maladies communes, accidentelles ou opportunistes chez les humains.

E. cuniculi et les autres membres de ce phylum, sont tous parasites obligatoires intracellulaires qui affectent les vertébrés et les invertébrés. Ils sont à l'origine de spores unicellulaires avec un sporoplasme uni ou bi nucléé qui est injecté dans la cellule hôte par un appareil extrusif caractérisé d'un tubule polaire (ou filament polaire) enroulé dans la spore, et une capsule polaire. La classification scientifique des microsporidies a évolué à travers le temps avec des recherches et des débats toujours en cours, malgré ça plus de 1200 espèces sont identifiées de nos jours regroupées sous 143 genres. Actuellement 14 espèces parmi 8 genres sont connues pour infecter les humains (Tableau I):

Tableau I. Classification des espèces du phylum des Microspora qui infectent l'homme. (1)

Famille	Genre	Espèce
Nosematidea	<i>Brachiola</i>	<i>B. algerae</i> , <i>B. vesicularum</i>
Encephalitozoonidea	<i>Encephalitozoon</i>	<i>E. cuniculi</i>, <i>E. hellem</i>, <i>E. intestinalis</i> (syn. <i>Septataintestinalis</i>).
Enterocytozoonidea	<i>Enterocytozoon</i>	<i>Enterocytozoonbieneusi</i> ,
Microsporidea	<i>Microsporidium</i>	<i>M. ceylonensis</i> , <i>M. africanum</i>
Nosematidea	<i>Nosema</i>	<i>N. ocularum</i> , <i>N. connori</i> (syn. <i>B. connori</i>)
Pleistophoridae	<i>Pleistophora</i>	Sp.
Pleistophoridae	<i>Trachipleistophora</i>	<i>T. hominis</i> , <i>T. anthropophthera</i> ,
Nosematidea	<i>Vittaforma</i>	<i>Vittaformacorneae</i> (syn. <i>Nosema corneum</i>)

1.2.2.Souches et Caryotypes d'*E.cuniculi*

Le génome nucléaire d'*E. cuniculi* est relativement petit ($2,9 \times 10^6$ paires de bases de nucléotides) en plus de la rareté des séquences non codantes de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) Microsporidien, ce qui confère aux parasites le pouvoir d'encoder l'information nécessaire à l'infection, la réplication et la dissémination d'une manière très efficace. Ceci laisse à penser qu'ils sont très adaptés pour survivre chez leurs hôtes. Les souches et caryotypes d'*E.cuniculi* ont été établies à partir du nombre de répétition de la séquence 5'-GTTT- 3'dans le transcrit de gène de l'ARN (Acide Ribonucléique) ribosomal pour les souches, et les désintégrations caryotypiques sont basées sur la migration sur gel d'électrophorèse dans un champ pulsé. Ainsi plus de 3 souches ont été déterminées :

La souche I (qui contient trois fois la séquence 5'–GTTT– 3', Caryotype A, B et C qui infectent les lapins, les souris et les humains), La souche II, (Caryotype F qui infecte les renards bleus et les souris), La souche III (avec quatre répétitions de la séquence de l'ARN, Caryotypes D et E qui infectent les chiens domestiques et les humains) et Les souches non classées infectent de nombreux mammifères : les rats, les cobayes, les hamsters, les chevaux, les poules, les visons, les primates non humains... Des isolats d'humains aux Etats-Unis ont montrés des souches III, cependant en Europe les isolats appartiennent à la souche I.

I.3.Morphologie :

Généralement les microsporidies sont de forme ovale, très petites et leurs spores ne dépassent pas 2-5 μm x 1-3 μm , Dans le cas d'*E.cuniculi* les spores mesurent 2.5 μm x 1.5 μm . C'est des organismes eucaryotes avec un noyau organisé et une enveloppe nucléaire cependant ils ont un ARN ribosomal de type procaryote et n'ont ni mitochondries, ni peroxysomes, ni de véritable appareil de Golgi, il semblerait que le rôle principal de leur hôte est de leur assurer de l'énergie.

Les spores sont à la fois l'élément de résistance dans la nature et la forme infectante du parasite, même si leur taille et ultrastructure varient selon les genres ils ont des caractères généraux communs : elles possèdent une paroi, un sporoplasme, une vacuole antérieure et une vacuole postérieure, le filament polaire avec son disque d'ancrage.

-La paroi : elle comporte une seule valve chitineuse, de structure trilaminaire, constituée de l'extérieur vers l'intérieur d'une exospore, une endospore et une membrane interne péricytoplasmique.

-Le sporoplasme : relativement dense uni- ou binucléé.

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

-La vacuole postérieure : elle est plus ou moins développée et peut être absente. Lorsqu'elle existe le tubule polaire s'enroule sur elle, et également elle peut se dilater lors de l'extrusion de ce dernier.

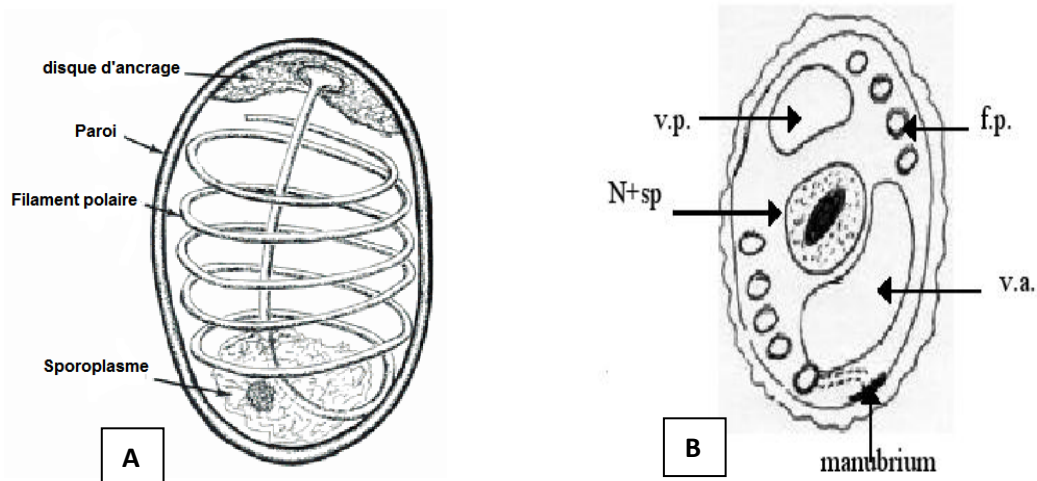


Schéma01. Représentation Tridimensionnelle d'une spore au microscope électronique (A) (EUZEBY, 1987).

Représentation d'une spore d'*E. intestinalis* en section transversale au microscope électronique à transmission. (f.p : sections du filament polaire ; v.a : vacuole antérieure ; v.p : vacuole postérieure ; N+sp : noyau et sporoplasme) (B) (GUTIERREZ, 2000).

-Le filament polaire : qui est fixé à la face interne du pôle apical de la spore sur un disque d'ancrage (ou manubrium). Il est enroulé en spirale et occupe la quasi-totalité de la spore, ce filament est creux et composé de deux membranes. Il peut être très long et atteindre 500 micromètres et est dévaginable. Le nombre de tours de spirales est un critère de classification. L'ensemble vacuole antérieure-filament polaire constitue l'appareil d'extrusion de la spore.

Les éléments permettant de distinguer les différents genres sont : la taille des spores, la morphologie et la configuration nucléaires des formes parasites successives, les stratégies de répliquations employées et les interactions avec la cellule hôte. Récemment, vu le succès des méthodes moléculaires et génétiques en phylogénétique, elles sont employées soit pour vérifier la validité d'un nom proposé, soit pour rectifier une classification générique.

I.3.1.En microscopie optique :

I.3.1.1.Parasite à l'état frais :

Les spores d'*E. cuniculi* sont isolées ou groupées en amas formant des pseudo-kystes de 10 à 50 µm, selon leur localisation tissulaire on les retrouve dans : des monocytes, des macrophages, des cellules nerveuses et des cellules rénales, au sein d'une vacuole parasitophore (EUZEBY, 1987).

Ces spores ont une forme ovale, parfois arrondie mais l'une des extrémités toujours plus large que l'autre. A l'une des extrémités de la spore on observe une capsule polaire c'est une vacuole transparente est réfractaire qui devient évidente en diaphragmant. Le noyau est excentrique,

compact, arrondi, ovale ou parfois en bande. Il occupe $\frac{1}{4}$ jusqu'à $\frac{1}{3}$ du parasite. Le filament et la capsule polaire sont difficilement ou non-visibles, d'où –jadis- l'origine de la confusion des chercheurs entre *E.cuniculi* et *Toxoplasma gondii*. Cependant des différences sont perceptibles :

Les spores d'*E.cuniculi* sont plus petites que les bradyzoites de *Toxoplasma gondii*.

Les pseudo-kystes de dimensions comparables, sont moins denses que ceux du Toxoplasme.

En plus les spores d'*E.cuniculi* sont fluorescentes sous la lumière de Wood car leur paroi est formée de chitine.

I.3.1.2.Parasite avec coloration :

Sous le microscope photonique les spores d'*E.cuniculi* sont des corps intracellulaires qui prennent plusieurs colorations. Les différentes méthodes de colorations utilisées par les chercheurs avaient principalement pour but la différenciation des microorganismes de *Toxoplasma gondii* de ceux d'*E.cuniculi*.

La coloration de routine au bleu de Toluidine donne une couleur bleue sombre aux microsporidies. Les méthodes de Gram de WEIGERT (Hématoxyline ferrique) sont des méthodes électives pour faire apparaître *E.cuniculi*, également utiles pour le diagnostic différentiel, mais aussi lors de présence de débris nécrotiques abondants qui camouflent un nombre de parasites ou bien lorsque le nombre de spores est en quantité limitée dans la préparation.

Tableau II. Diagnostic différentiel histologique des affections Dues à *E.cuniculi* et *Toxoplasma gondii*. (INNES G.R.M et coll., 1962).

Méthode	<i>E. cuniculi</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Hématoxyline-éosine	Faiblement colorable	Modérément colorable
May Grunwald-Giemsa	Bleu brillant	Mauve
P.A.S.	Rouge (positif)	Rouge (positif)
Gramm	Bleu (positif)	-
Hématoxyline-ferrique	Noir	-
Imprégnation argentique (WILDER)	-	Noir (paroi du kyste)
Fuch sine carbolique(GOODPASTURE) magenta	-	-

Tableau III. Diagnostic différentiel histologique des affections Dues à *E.cuniculi* et *Toxoplasma gondii*. (SCANZIANI E. et coll., 1985).

Méthode	<i>E.cuniculi</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Hématoxyline-éosine	Rose-Violet	Rose-Violet
Hématoxyline ferrique	Bleu foncé	Bleu violacé
Giemsa	Bleu	Bleu
Goodpasture	Rouge vif	Rouge rose
Ziehl-Neelsen	Violet	Violet
Bleu-Alcian	-	Bleu pale
Gram	Bleu (positif)	-
Gomori (imprégnation argentique)	Brun	Noir
Fuch sine carbolique-Bleu de méthylène	Rougeâtre	Bleu foncé

Tableau IV. Diagnostic différentiel histologique des affections Dues à *E.cuniculi* et *Toxoplasma gondii*. (LEVINE N.D., 1985).

Méthode	<i>E. cuniculi</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Hématoxyline-éosine	Faiblement colorable	Rose violet
Fuch sine carbolique-Bleu de méthylène (WRIGHT et CRAIGHEAD)	Rouge foncé	Bleu
Hématoxyline-ferrique	Noir	-

I.3.1.En microscopie électronique :

Toute la machinerie cellulaire et les organites sont nettement plus visibles et distinguables comparés au microscope optique Les parasites sont localisés dans des vacuoles parasitophore à l'intérieur des cellules et se montrent dans tous les stades de développement. Mais le développement des vacuoles ne devient apparent qu'après 24 heures de la pénétration du parasite dans la cellule (PAKES et al., 1975).

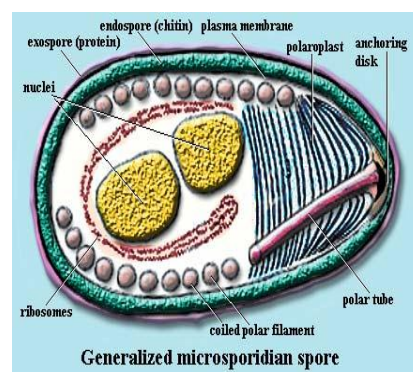
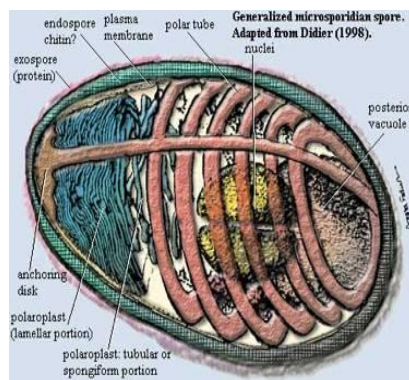


Schéma02.Représentations d'une spore au microscope électronique démontrant les organites internes du parasite. (1)

II. CYCLE PARASITAIRE :

Le cycle de vie d'*E. cuniculi* est similaire (comme décrit ci-dessous) chez les humains et les animaux, Le parasite est retrouvé dans les cellules épithéliales. Beaucoup d'espèces animales lui sont réceptives et les résultats obtenus dans les infections expérimentales ou observés dans la nature indiquent que le parasite est peu spécifique. En effet, c'est l'unique microsporidie connue infectant les humains pour laquelle le réservoir animal naturel est connu (DEPLAZES et al., 1996). La durée d'évolution du cycle est brève et dure 24 à 48 heures et peut être liée à des facteurs d'environnement extrinsèques, ou intrinsèques concernant l'animal.

II.1.Phase d'infection :

Le mode de transmission détermine le site d'infection primaire, le plus commun est les cellules épithéliales gastro-intestinales. *In vivo*, au contact du parasite avec la cellule réceptrice on a l'extrusion du filament polaire et l'injection du sporoplasme. Cette extrusion a lieu suite à une stimulation par un signal environnemental, et est due en théorie soit à un changement du pH, soit à une augmentation brusque de la pression osmotique *In vitro*, l'extrusion est améliorée par l'addition d'ions de Calcium ou d'H₂O₂ (eau oxygénée).

II.2.Phase de prolifération :

Cette phase se résume en la division par scissiparité du sporoplasme introduit dans la cellule, elle est aussi appelée mérogonie car elle aboutit à la formation de formes prolifératives (mérontes), délimitées par une membrane plasmique, englobées dans une vacuole parasitophore. (DIDIER et al, 2000)

II.3.Phase de différenciation :

En premier lieux les mérontes sont alignées et attachée à la membrane plasmique, il y a formation des organelles des spores avec épaissement de la membrane et densification du cytoplasme. Les mérontes se différencient en sporoblastes puis en spores contenues dans des sporontes. Une spore est mature lorsqu'elle se caractérise par les entrecroisements du tubule polaire. Par la suite, l'élargissement continu de la vacuole parasitophore et/ou la cellule hôte conduit à sa rupture et au largage des spores dans le compartiment extracellulaire. Les conséquences engendrées par ce fait sont : Une réaction inflammatoire vis-à-vis du contenu cellulaire, à long terme on aura une inflammation chronique avec développement de lésions granulomateuses. (DEVVERIRE, 2003 ; DIDIER et al, 2000 ; EUZEBY, 1987)

Dissémination et extension des spores dans les cellules adjacentes empruntant la voie vasculaire et/ou par le biais du système des phagocytes mononuclées. L'infection des sites de prédilections

comme le rein et le tractus respiratoire laisse retrouver les spores dans les urines aux alentours du 30^{ème} jour de l'infection, de même dans les sécrétions respiratoires.

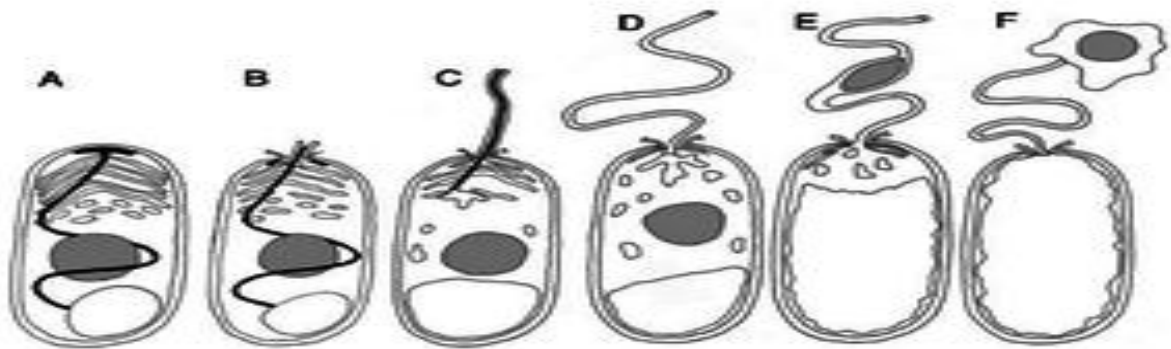


Schéma03. Figure explicative de la phase d'infection avec les étapes d'extrusion du filament tubulaire. (2)

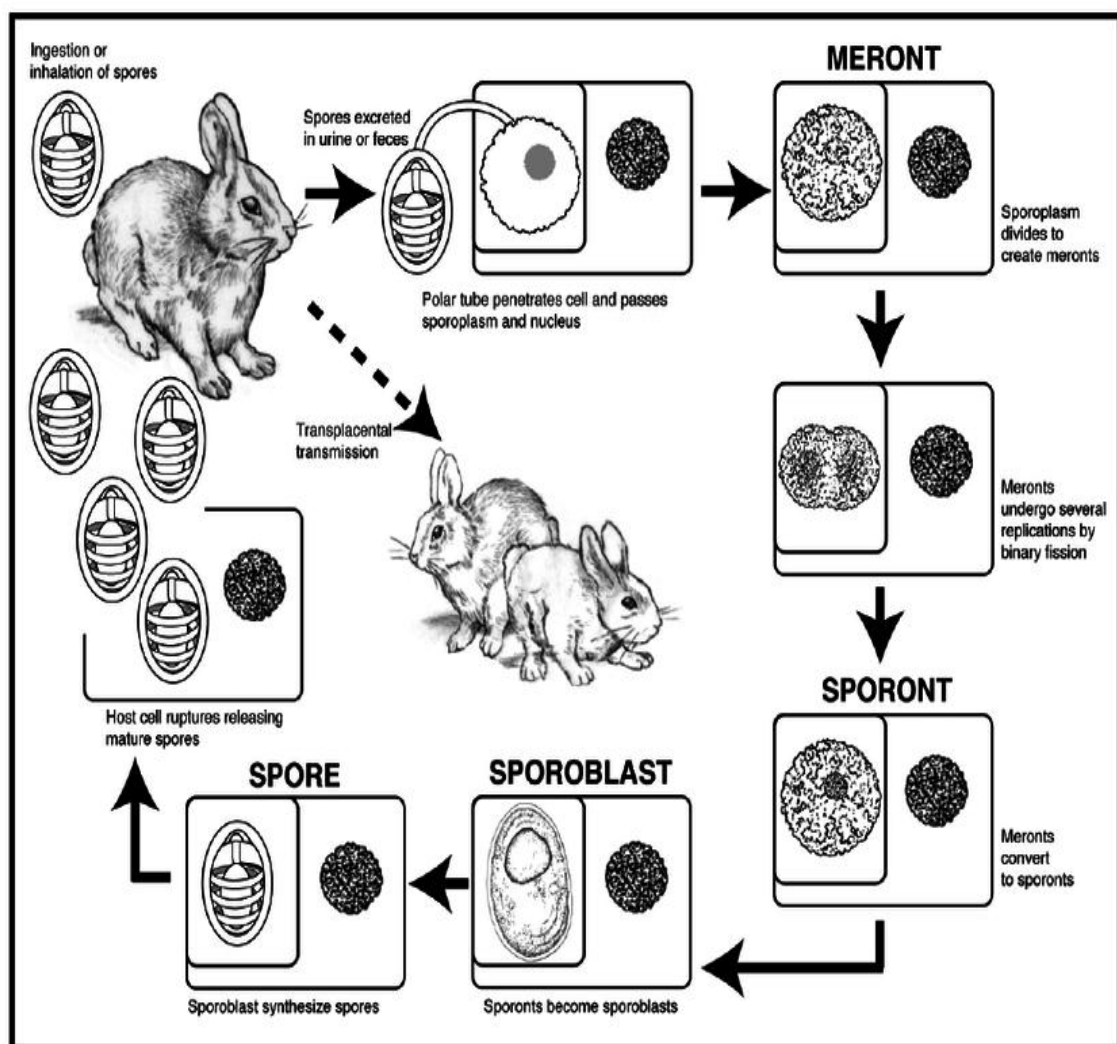


Schéma 04. Cycle de vie général d'une microsporidie. (3)

III.L'ENCEPHALITOZOONOSE DU LAPIN :

III.1.EPIDEMIOLOGIE :

III.1.1.Epidémiologie descriptive :

III.1.1.1.La Prévalence :

A. Chez le lapin de laboratoire :

A un certain moment le parasite était très prévalent (20-95%) mais avec les bonnes mesures d'hygiène et le contrôle avec les enquêtes sur l'état de santé des animaux la prévalence devint faible (MATHIS et al., 2005 ; KUNZEL et al., 2008). Il est utile de noter la présence d'anticorps dans le sérum des animaux puisque ils ont déjà été en contact avec le parasite d'où immunisation. Par contre, ceux qui sont séropositifs sont sacrifiés.

B. Chez le lapin d'élevage :

E. cuniculi sévit dans les élevages cunicoles comme enzootie, la séroprévalence toujours variables en fonction d'hygiène, la généalogie des animaux et l'état des lieux.

C. Chez le lapin sauvage :

Dans les populations de lapins sauvages, le parasite est nettement moins prévalent probablement a cause de la faible densité des animaux (WILSON 1979 ; COX et ROSS 1980 ; CHALUPSKY et al., 1990). La prévalence reste minime même si les lapins sont nés en captivité puis relâchés dans la nature.

D. Chez le lapin de compagnie :

La séroprévalence est usuellement élevée et peut atteindre 37-68% de cette population (EWRINGMANN et GOBEL 1999 ; HARCOURT-BROWN et HOLLOWAY 2003 ; EBRECHT et MULLER, 2004). La majorité des résultats a été obtenue sur des lapins tout venants, présentés à une consultation, sains ou malades. Une étude récente dirigée par KEEBLE et SHAW (2006) 52% des lapins sains apparaissent séropositifs.

III.1.1.2.Importance économique :

La perte économique est considérable vue l'élimination des animaux cliniquement malades ou même séropositifs (animaux d'élevages et de laboratoires). Il ne faut pas négliger la chute de la valeur bouchère à l'abattage puisque la performance de croissance est à 11% inférieure chez les lapereaux en croissance, surtout si l'atteinte est localisée sur les membres postérieurs (paralysie) par atrophie musculaire. Pour ce qui est du lapin de compagnie, le traitement est couteux, et

souvent la thérapie curative lourde pour l'animal, mais par-dessus-tout la valeur sentimentale pour le propriétaire.

Tableau V. Prévalence des infections à *E. cuniculi* chez le lapin déterminé par la sérologie. (FRANK K et ANJA J, 2009).

Pays	Auteurs	Méthodes	Catégorie/statut sanitaire des animaux	Total	Séropositivité	
					Nombre	%
Australie	Cox et Pye 1975	IFAT	laboratoire	191	98	51.3
Suède	Waller, 1977	CIA	laboratoire	200	41	23.5
République Tchèque	Chalupsky et al., 1979	IFAT	Laboratoire/élevage	+500	-	0-95
Australie	Cox et al., 1980	IFAT	sauvage	823	0	0
Royaume uni	Cox et Ross 1980	IFAT	sauvage	175	0	0
Norvège	Lyngset, 1980	CIA	élevage	68	46	73
Allemagne	Lev, 1982	CIA/IFAT	Laboratoire/élevage	276	17	6.2
Allemagne	Neuwirt, 1988	IFAT	Compagnie	42	17	40.5
			Laboratoire/élevage	142	5	3.5
			sauvage	155	28	18.1
France	Chalupsky et al., 1990	IFAT	sauvage	204	8	3.9
Allemagne	Meyer-BreckwoldT., 1996	CIA	Compagnie	200	84	42
			sauvage	100	0	0
Australie	Thomas et al 1997	IFAT	sauvage	81	20	24.7
Suisse	Muller, 1998	ELISA/IFAT	Elevage asymptomatique	292	22	7.5
			Compagnie suspect	72	61	84.7
Allemagne	Ewringmann et Gobel 1999	CIA	compagnie	277	125	45.1
Turquie	Eroksuz et al 1999	CIA	Laboratoire/élevage	150	98	65.3
Slovaquie	Halanova et al., 2003	IFAT	-	571	238	41.7
Royaume Uni	Harcourt-Brown et Holloway 2003	ELISA	Compagnie asymptomatique	38	14	36.8
			Compagnie suspect	87	60	69
			Signe neurologique	53	38	71.7
			Maladie vestibulaire	23	21	91
			Lésion oculaire	9	9	100
Royaume Uni	Keeble et Shaw, 2006	ELISA	Compagnie asymptomatique	97	50	52
Autriche	Kunzel et al 2008	IFAT	Compagnie asymptomatique	54	20	37
			Compagnie suspect	184	144	78.3

			Signe neurologique	144	108	77.1
			Maladie vestibulaire	104	95	91.3
			Lésion oculaire	25	21	84
Italie	Dipineto et al 2008	CIA/ELISA	Compagnie asymptomatique	47	32	68.1
			Compagnie suspect	48	52	66.7
			Signe neurologique	42	32	76.2
Japon	Igarashi et al 2008	ELISA	Compagnie bonne santé	195	113	57.9
			Compagnie signe neurologique	105	85	81
			Compagnie autres signes	37	16	43.2
Niger	Okewole, 2008	IFAT	asymptomatique	237	39	16.5
Autriche	Csokai et al., 2009	IFAT	Compagnie autres maladies	38	19	50
			Compagnie suspect	33	23	69.7
Italie	Santaniello et al., 2009	CIA/ELISA	élevage	1600	505	31.6

III.1.2.Epidémiologie analytique :

III.1.2.1.Source du parasite :

La source la mieux connue des spores est l'urine des animaux hébergeant le parasite au niveau rénal, en effet, la lyse des cellules infectées conduit à l'élimination des spores environs 30jours post-infection. Une autre possibilité envisageable, c'est la voie digestive par élimination des spores avec les fèces lors du premier épisode infectieux par ingestion du parasite. (GEVREY J, 1993 ; EUZEBY J, 1987 ; DIDIER et al, 2000)

III.1.2.2.Mode d'infection :

La principale voie de contamination est la voie buccale (ou nasale) par léchage, inhalation ou ingestion d'aliments souillés par les urines, en plus de tétée d'une mamelle souillée. La voie vaginale est suspectée puisque le parasite peut se trouver dans le sperme. L'infection placentaire a été confirmée, par sérologie sur lapereaux nouveau-nés, puis par des preuves expérimentales (BANEUX et POGNAN, 2003) sur des lapines gestantes séropositives, après isolement du placenta par césarienne : les mères, les fœtus et les placentas sont tous contaminés par la même souche. Expérimentalement, les voies : intraveineuse, intra-péritonéale, intra-trachéale, orale et rectale ont été utilisées avec succès.

III.1.2.3.Prédispositions :

Age : n'a pas de relation apparente avec la séropositivité, par contre la morbidité est plus élevée chez les jeunes et les expressions cliniques qui sont variables en fonction de l'âge.

Sexe : ce facteur est peu significatif, des études sur des lapins séropositifs ont données 33% femelles et 67% males, mais pour des lapins séronégatifs 54% sont des femelles et 46% des males (HARCOURT-BROWN, 2004).

Race : prédisposition chez le lapin nain plus élevée (KUNSTYR et NAUMANN, 1985) mais il faudrait principalement prendre en considération le mode de vie et l'exploitation du lapin.

Etat immunitaire et maladie : plusieurs auteurs rapportent que 70% des lapins atteint d'encephalitozoonose sont souffrant d'une autre maladie (coccidiose, pneumonie, abcès sous-cutané...). Les lapins nains, nains Angora et Blancs de Nouvelle Zélande ont une réponse immunitaire affaiblie et semblent prédisposés. Le sevrage précoce, l'administration de corticoïdes et les carences alimentaires jouent un rôle dans la fragilisation du système immunitaire.

III.1.3.Epidémiologie synthétique :

La séroprévalence chez les lapins sauvage vivant dans la nature semblerait être moindre voire nulle comme l'ont montré les travaux en Australie, Royaume Uni et Allemagne (**tableau IV**), ces animaux ont moins de risque de se recontaminer avec les spores qu'ils excrètent. La théorie de recontamination a été expliquée par THOMAS et al., (1997) ou il a trouvé que la prévalence chez les lapins sauvages est moins de 20% par opposition à celle des animaux de laboratoires qui est de 76%, cela est probablement dû à leur mode de vie dans des lieux confinés et surpeuplés.

Pour les lapins de compagnie la séropositivité élevée demeure inexpliquée, des expérimentations faites sur des animaux vivant en groupes, on trouvait au moins un individu séronégatif parmi ses compagnons séropositifs, ça peut être lié aux bonnes mesures d'hygiène.

IV. SYMPTOMES :

E.cuniculi provoque soit une maladie chronique (sub-clinique) qui n'aura une influence que sur le gain du poids, celle-ci pouvant être de 11% inférieur à celle des lapins non infectés, soit une maladie clinique avec des lésions au niveau du système nerveux central, des reins et/ou des yeux. Le taux de morbidité est variable de 9.1% à 88.9% dans les élevages.

De ce fait les lapins souffrant peuvent montrer des signes neurologiques, une insuffisance rénale ou une uvéite phacoclastique. Les trois formes de la maladie peuvent apparaître individuellement ou combinées, mais la forme neurologique semble clairement être la dominante des manifestations cliniques (MEYER-BRECKWOLDT, 1996). Dans la plupart des cas, l'apparition des signes cliniques est soudaine et souvent fait suite à un événement stressant dans la vie du lapin.

IV.1. symptômes nerveux :

Le signe nerveux le plus fréquemment observé chez le lapin atteint d'encephalitozoonose est la maladie vestibulaire (KUNSTYR et NAUMANN, 1985 ; HARCOURT-BROWN et HOLLOWAY, 2003 ; JASS et al., 2008) en plus de l'inclinaison de la tête et l'ataxie. La maladie vestibulaire se présente par : un nystagmus, un mouvement rotationnel autour de l'axe de longueur du corps. Habituellement, les conditions générales et l'appétit de l'animal même avec des signes sévères ne sont pas altérés. Les lapins avec inclinaison de la tête accrue exhibent plus souvent des mouvements de roulement suivi d'une répugnance au déplacement. Une période d'immobilisation peut être consécutive au désordre vestibulaire et donc peut limiter la récupération de ce dysfonctionnement (THOMAS, 2000). D'autres symptômes nerveux sont observés au cours de l'encephalitozoonose, tremblements de la tête, torticolis, opisthotonos, crises convulsives, hyperesthésie, faiblesse du train postérieur, incoordination motrice, perte d'équilibre, parésie, paralysie et parfois coma... Occasionnellement, les lapins démontrent un changement de comportement (agressivité, court et saut contre les grilles de la cage et automutilation) et déficit du nerf crânien (EWRINGMANN et GOBEL, 1999 ; HARCOURT-BROWN et HOLLOWAY, 2003, JORDAN et al., 2006). Certains lapins peuvent manifester des incontinenances urinaires ou bien au contraire des rétentions urinaires.

IV.2. symptômes rénaux :

La majorité des cas avec une néphrite interstitielle chronique due à une infection à *E.cuniculi* sont sub-clinique. Par conséquent, une azotémie est communément et accidentellement détectée chez les lapins. Les insuffisances rénales chroniques peuvent engendrer une anémie et des ostéodystrophies causant des fractures pathologiques des os long (EWRINGMANN et GOBEL, 1999). L'évidence des signes de polyurie-polydipsie chez les animaux avec une azotémie confirmée sont discutés dans la littérature (DIPINETO et al 2008 ; KUNZEL et al., 2008).

IV.3. Symptômes ophtalmologiques :

Une uvéite phacoclastique a été reportée chez beaucoup d'espèces animales, mais le Lapin est relativement l'unique espèce chez laquelle la rupture de la capsule du cristallin est induite sans antécédent de traumatisme (WOLFER et al., 1993). La majorité des lapins souffrant de l'uvéite phacoclastique sont de jeunes individus (GRAHN et al, 1991), les signes oculaires sont le plus souvent unilatéral, les lésions bilatérales sont détectées occasionnellement (ASHTON et al., 1976) et dans beaucoup de cas les propriétaires reportent une masse blanchâtre dans l'œil, elle est originaire du décollement de la capsule du cristallin avec une inflammation centrée autour du point de rupture (hypopion).



Image 01. Lapin présentant un torticollis (A), Uvéite phacoclastique chez un lapin (B), Lapin d'un mois souffrant d'une paralysie des membres postérieurs due à *E. cuniculi*(C).

(6) ; (7)

Outre que l'uvéite, d'autres caractères de degrés variables peuvent être diagnostiqués avec un examen ophtalmologique. Normalement, les lapins concernés ne montrent pas une perte considérable des fonctions visuelles (FECHLE et SIGLER, 2002) quoique, le parasite est impliqué parfois dans une cataracte de l'œil chez l'animal de laboratoire.

IV.4. Autres symptômes :

En début d'infection, *E. cuniculi* peut se développer dans les poumons et impliquer des difficultés respiratoires, on peut avoir des fractures pathologiques et mêmes des ascites.

V. LESIONS :

L'ingestion de spores d'*E. cuniculi* conduit à l'infection de l'épithélium intestinal, puis via le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), les spores se disséminent dans le torrent sanguin vers plusieurs organes : cerveau, poumons, reins et foie. L'infection se fait par des spores libres ou par l'intermédiaire de monocytes infectés (MARCATO et ROSMINI, 1986). Les sites de prédilections finaux sont le cerveau et les reins. Pendant la transmission intra-utérine qui semblerait seulement jouer un rôle mineur, les spores peuvent aussi atteindre la capsule antérieure du cristallin.

V.1.Macroscopiquement :

Les infections cérébrales causent typiquement des méningo-encéphalites granulomateuses et une néphrite interstitielle chronique avec des cicatrices macroscopiquement visibles ou le tissu est rétracté (FLATT et JACKSON, 1970). L'apparence du rein est ficelée avec des foyers déprimés, pales à plus foncé, irréguliers et circulaires sur le cortex rénal. En début d'infection, l'inflammation granulomateuse est focale, ensuite lors d'évolution elle donne une fibrose

interstitielle avec effondrement du parenchyme, on a l'impression que le rein est vieux et ficelé. Les changements sont bilatéraux, blanc-grisâtres et sont d'autant plus apparents après fixation au formol. Au retrait de la capsule, il n'y a pas d'arrachement du parenchyme rénal. Hormis l'aspect des reins, on peut avoir une légère réaction splénique aspécifique. Cependant, les lésions rénales évidentes à l'autopsie fournissent une méthode simple et peu onéreuse de détecter une ancienne infection.

V.2.Histologiquement :

V.2.1.Description des lésions :

Une étude était faite sur une population de lapins de compagnie (KUNZEL et al., 2008), regroupant des individus de tout âge (4mois-13ans) avec ou sans symptômes d'encephalitozoonose. Le but de cette étude, était de trouver une corrélation possible entre les manifestations cliniques et les changements morphologiques dans différents organes par le moyen d'examen histologique post-mortem. Un nombre de 71 lapins de compagnie qui devaient être euthanasiés ou déjà mort ont subi un examen. Les animaux sont des deux sexes, divisés en trois groupes : le 1^{er} englobe des animaux manifestant des signes évocateurs d'Encephalitozoonose, le 2^{ème} regroupe des animaux morts/euthanasié pour d'autres raisons et le 3^{ème} concerne des animaux témoins sains.

Tableau VI. Nombre de lapins du groupe 1 avec différents symptômes indicatifs de l'encephalitozoonose.

Groupes	Symptômes	
1 =33 individus	manifestant des signes évocateurs de l'encephalitozoonose	- Désordre Vestibulaire(14) - Uvéite Phacoclastique (6) - Insuffisance Rénale (8) - Désordre Vestibulaire+ Insuffisance Rénale (3) - Désordre Vestibulaire + Insuffisance Rénale + Uvéite Phacoclastique (1) - Désordre Vestibulaire + Uvéite Phacoclastique (1).
2 = 38 lapins	Morts/euthanasiés pour d'autres raisons.	
3 = 20 lapins	dérivés de deux laboratoires introduits pour control négatif (témoins).	

Les lésions observées avec les deux colorations de Ziehl-Neelsen et le Trichrome de Masson, sont pour la plupart une encéphalite granulomateuse non suppurative combinée à une néphrite interstitielle. La néphrite interstitielle a pu être identifiée seule sans atteinte cérébrale chez

quelques sujets mais avec détection de spores. Parmi ces deux catégories, 8 lapins ont montré une infiltration inflammatoire non suppurative dans le parenchyme pulmonaire, 9 animaux avec une hépatite granulomateuse non suppurative et 13 lapins ont eu des infiltrats inflammatoires dans le cœur. Au niveau oculaire, 10 lapins ont montré une uvéite non suppurative, 1 lapin a eu une cataracte unilatérale contre 2 autres avec une cataracte bilatérale. Un autre animal a montré une nécrose focale des fibres de la lentille.

V.2.1.1. Système nerveux :

La méningo-encéphalite chronique lymphocytaire non suppurative accompagnée de granulomes focaux ou multifocaux. L'inflammation peut concerner le tissu astrocytaire et on peut observer une infiltration lymphocytaire périvasculaire.

L'étendue de l'encéphalite granulomateuse peut couvrir toutes les parties du cerveau avec une distribution périvasculaire. Le granulome typique présente un centre nécrotique très circonscrit entouré de grands macrophages, de quelques lymphocytes, d'une réaction de cellules gliales et plus rarement de cellules géantes. On peut également trouver des granulomes épithéloïdes sans centre nécrotique. La lésion inflammatoire primaire est une périvasculite avec des manchons cellulaires périvasculaires composés de macrophages d'origine gliale et des lymphocytes. Dans les macrophages on peut observer quelques parasites. Ces lésions ont tendances à être plus diffuses et plus sévères chez les lapins dont le cerveau contient des pseudokystes. La présence d'*E.cuniculi* dans le système nerveux périphérique est rare et peut expliquer des cas avec des signes neurologiques inhabituels. Toutes ces lésions n'apparaissent généralement pas lors du premier mois d'infection. (WASSON et al, 2000 ; MARCATO PS, 1990)

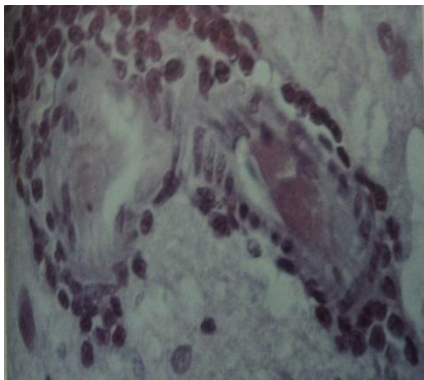


Image 02. Encephalitozoonose. Périvasculite « Cuffing »,
Encéphalite non purulente due à *E.cuniculi*.
Microphotographie. Ziehl-Neelsen. (MARCATO P.S. et
ROSMINI R, 1986).

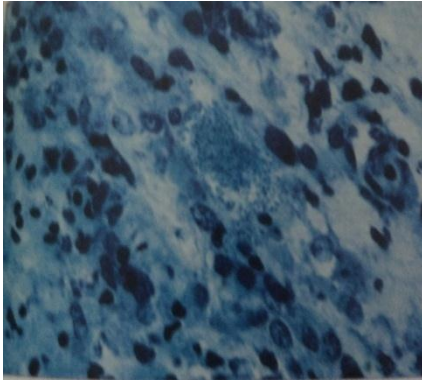


Image 03. Encephalitozoonose. Amas de microsporidies au centre d'un grandulome encéphalique. Microphotographie. May Grunwald-Giemsa. (MARCATO P.S. et ROSMINI R., 1986).

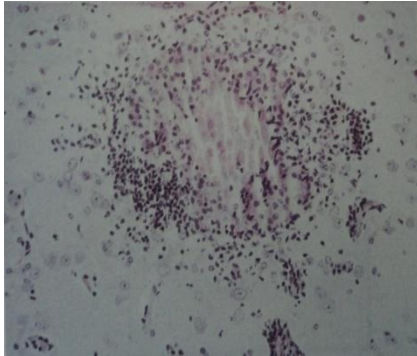


Image 04. Encephalitozoonose. Granulome cérébral avec nécrose centrale. Microphotographie. (MARCATOS P.S et ROSMINI R., 1986).

V.2.1.2.Rénale :

Au niveau cortical et médullaire, les premières lésions qui apparaissent sont une néphrite interstitielle granulomateuse lymphocytaire, focale à segmentée. Ces lésions sont plus fréquentes au niveau de la papille rénale. Des spores ovoïdes peuvent être observées à l'intérieur des cellules ou libres dans les tubes collecteurs. Tardivement, une **fibrose** s'installe mais les parasites ne sont plus apparents. On peut aussi avoir des infiltrations interstitielles lymphoïdes péritubulaires nécrotiques. (LEVINE, 1985; HARCOURT-BROWN et HOLLOWAY, 2003: EROKSUZ et al, 1999)

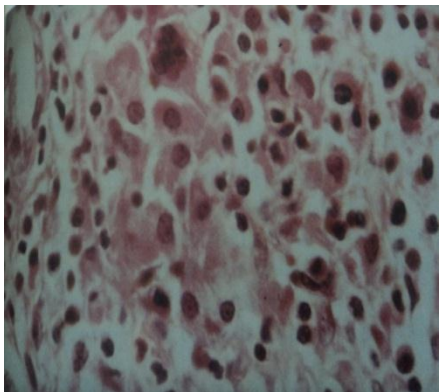


Image05. Encephalitozoonose. Microgranulome épithéloïde. (MARCATO P.S. et ROSMINI R, 1986).

V.2.1.3. Oculaire :

La majeure lésion observée est la rupture de la capsule antérieure du cristallin et la présence de neutrophiles dans le cortex cristallinien avec une **zone** d'inflammation bien délimitée. Dans le cortex du cristallin en profondeur il y a présence de neutrophiles, autour d'eux une couche de macrophages surmontés d'un anneau de tissu fibreux contenant des lymphocytes et des cellules sanguines. Le segment postérieur du cristallin n'est pas altéré, mais à l'examen les yeux affectés contiennent presque toujours des parasites dans le cristallin. Aucun organisme n'est détecté hors du cristallin. (WOLFER et al, 1993)

V.2.1.4. Autres lésions :

D'autres lésions inflammatoires peuvent être mises en évidence dans le foie, le poumon, la rate, le myocarde et les muscles squelettiques. Les foyers d'infiltration lymphocytaire et macrophagique sont péri-vasculaires, multifocaux et interstitiels. Ces lésions font partie de la réponse immunitaire générale de l'organisme.

Dans le foie, on peut retrouver le parasite dans les hépatocyte, l'inflammation est localisée aux canaux biliaires ou une hépatite focale non suppurative. Dans les poumons, *E. cuniculi* peut infiltrer les parois alvéolaires et induire une pneumonie interstitielle histiocytaire. Dans le cœur, Une myocardite peut avoir lieu avec séparation des fibres musculaires cardiaques par une infiltration diffuse ou focale des cellules mononucléaires. (MARCATOS, 1990 ; BANEUX et POGNAN, 2003 ; VANASSE-SAINT-JACQUES, 1984)

VI. IMMUNITE :

La réponse immunitaire contre une infection à *E. cuniculi* a surtout été étudiée chez l'homme et la souris.

VI.1. Interaction hôte-parasite :

Selon les formes de la maladie et les lésions engendrées par le parasite on peut grouper la réponse immunitaire selon deux volets :

La maladie aiguë clinique conduit souvent à la mort. Elle est observée fréquemment chez les animaux nouveau-nés (surtout chiens, renards et singes écureuils) et les adultes immunodéprimés. Certains sujets néonataux peuvent se remettre de l'infection mais développeront ultérieurement des maladies auto-immunes.

Quant à la maladie chronique avec symptômes transitoires, puis silence clinique mais toutefois persistance de l'infection. Cette forme touche généralement les adultes, la résistance de l'hôte semble liée principalement à des mécanismes de défenses immunitaires.

Une étude faite sur des souris athymiques (ou avec immunodéficiência combinée) par SCHMIDT et SHADDUCK en 1983 (KOUDELA et al., 1993) a trouvé que ces souris succombent à l'infection. C'est-à-dire, des souris immunocompétentes infectées expérimentalement sont peu susceptibles de développer la maladie. Si elles sont mises sous traitement immunosuppresseur à base de corticoïdes, les symptômes se développent. Cela prouverait la persistance latente du parasite chez ces animaux.

L'infection latente asymptomatique pendant laquelle le parasite se multiplie et la réponse immunitaire de l'hôte sont donc dans la balance. A tout moment, l'équilibre peut être rompu en faveur ou défaveur de la multiplication des microsporidies.

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

VI.2.Intervention de l'immunité à médiation cellulaire :

Les mécanismes cellulaires sont importants pour le contrôle du parasite et la survie de l'hôte. En effet, Les souris citées plus haut (athymiques ou « knockout » pour les lymphocytes T CD8+ - Lymphocyte T ; Cluster de Différenciation 8-) meurent des suites de l'infection. De même, pour les personnes déficientes en lymphocytes T (Atteintes de SIDA –Syndrome d'ImmunoDéficiência Acquise-, ou suivant un traitement antirejet...) courent un risque plus important de déclarer un microsporidiose. Une action protectrice est observée chez les souris lors de transfert des lymphocytes T spécifiquement sensibilisées ou des cellules de rates enrichies avec ces lymphocytes. Cela a lieu grâce au relâchement des Interférons γ (Interférons γ) ainsi que peut-être d'autres cytokines. Les Cytokines : L'interféron γ (INF γ) et l'interleukine 12 (IL-12) semblent avoir un rôle important dans lutte contre le parasite, *in vitro* des macrophages incubés avec ces interférons sont activés et détruisent le parasite. On a également observé une augmentation des taux des IL-10 dans les cellules spléniques, or ils auraient un rôle dans la régulation de la réponse précédente.

Les LT CD4+/CD8+ : les LT CD8+ semblent plus efficaces, elles sont activées dès le 3^{ème} jour et augmentent significativement dès le 10^{ème} jour post-infection. Par opposition, le développement du parasite chez l'homme est favorisé par la baisse des LT CD4+ (SIDA).

Les LT CD8⁺ (cytotoxiques) produisent des cytokines, mais éliminent aussi la charge parasitaire par déléation des cellules infectées grâce aux perforines. Ces LT sont majoritairement activées par les LT CD4⁺ par l'intermédiaire de l'IL-2, cependant, dans le cas des souris ne disposant que de LT CD8⁺ l'immunité est très bien menée contre l'infection. Il est utile de mentionner l'action des LT $\gamma\delta$, elles sembleraient activer précocement les LT CD8⁺ par la production d'INF γ .

VI.3.Intervention de l'immunité à médiation humorale :

Par contraste aux mécanismes cellulaire, l'immunité humorale ne semble pas assez protectrice. Des anticorps contre *E. cuniculi* sont produits et persistent sur des périodes de long terme vu la nature de l'infection chronique. Ils sont générés chez les individus immunocompétents et y restent tout au long de la vie de l'hôte.

Quoiqu'il en soit, lors de l'infection par *E.cuniculi*, il peut se produire un grand nombre d'anticorps contre de nombreux antigènes et ces anticorps font même des réactions croisées avec d'autres microsporidies. Leur rôle est donc restreint, il se résume en l'opsonisation des microsporidies pour faciliter leur prise en charge par les macrophages, et en les neutralisant avant qu'elles infectent d'autres cellules saines. En plus, la fixation du complément pourrait causer la lyse des formes immatures du parasite. Enfin, il se trouve que les IgG (Immunoglobuline G) traversent le placenta, pour conférer une immunité passive aux lapereaux pendant au moins 2 semaines voire 6-7 semaines.

VII. DIAGNOSTIC :

VII.1. Ante-mortem :

VII.1.1.Le diagnostic de confirmation :

Le diagnostic définitive d'*E.cuniculi* *in vivo* est difficile, une tentative du diagnostic clinique et obtenue par combinaison des 3 signes majeurs (ophtalmiques, rénales, nerveux), des tests sérologiques, et l'exclusion des autres maladies (CSOKAI et al, 2009). La détection d'anticorps spécifiques confirme seulement un contact précédent avec le pathogène, plusieurs lapins cliniquement sains montrent un titre modéré jusqu'à élevé en anticorps. (HARCOURT-BROWN, 2004).

VII.1.1.1.Sérologie :

Chez des lapins infectés expérimentalement, l'apparition des IgM (Immunoglobuline M) et IgG vers le 13^{ème} jour (C'est-à-dire 15 jours avant que les spores ne soient décelables dans les urines) et persistent 2-3 mois avec un taux maximal vers la 6^{ème} semaine, sauf dans le cas de l'infection où l'immunité est stimulée. (BOOT et al, 2000)

1. ELISA :

Le principe de ce test est de fixer les anticorps recherchés entre les antigènes spécifiques fixés sur une lame, et les anticorps liés aux immunoglobulines recherchées et marquées d'une enzyme. Après lavage on ajoute un substrat de l'enzyme qui provoque l'apparition d'une coloration si le test est positif. Ainsi, la concentration en anticorps sériques est proportionnelle à la D.O. – Densité Optique- (BOOT et al, 2000)

2. Immunofluorescence Indirecte :

Son principe est de fixer les anticorps recherchés entre les antigènes spécifiques fixés sur une lame et les anticorps liés à une fluorochrome excité par des UV (Ultraviolets) réémet dans le visible (vert, orange, rouge). Le test est positif si la fluorescence est observable. On prépare des lames portant des antigènes à partir d'une suspension ou, d'une culture cellulaire de spores étalée sur des lames. On incube ces lames avec le sérum de l'animal à tester, puis elles sont lavées et colorées par des anti-immunoglobulines de lapin issues de sérum de chèvre liées à un fluorochrome. Ces lames sont ensuite lavées et séchées à l'air et examinées au microscope à fluorescence au grossissement x 200. (BOOT et al, 2000)

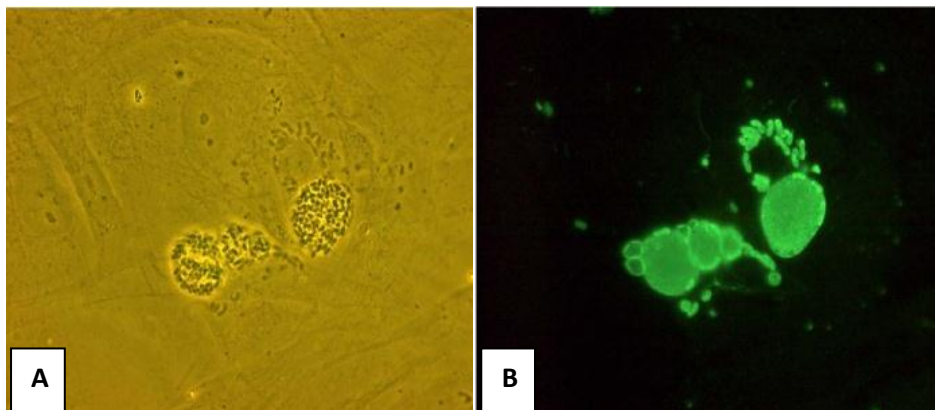


Image 06. Vacuole parasitophore dans une culture cellulaire en lumière blanche.(A) (Wawrzyniac, 2006), Même vacuole mise en contact avec un sérum positif (B).

3. Immunoélectrophorèse :

On fait migrer par électrophorèse sur gel un sérum de l'animal à tester mélangé à l'antigène (spores). En fonction du poids moléculaire la migration se fait. Le complexe anticorps-antigène peut être repéré par un trait de précipitation différent de ceux correspondant respectivement au sérum, ou à l'antigène. (BOOT et al, 2000)

4. Réaction à l'encre de chine ou Carbon Immuno Assay (CIA) :

Le principe est l'attachement des particules de Carbone sur une partie des IgG. On dilue le sérum de l'animal à tester puis on le mélange à une quantité équivalente de suspension d'antigènes (spores) et on le met en incubation. La suspension sérum-antigène est mélangée à l'encre de

chine sur une lame de microscope, application d'une lamelle et observation au microscope optique sous huile à immersion. Les spores (antigènes) sont colorées en noir ou gris suite à la fixation des anticorps sur la paroi des parasites. Les sérums positifs sont réexaminés à une dilution 1/2560^{ème} pour quantifier les anticorps. (EROKSUZ et al, 1999)

5. Test d'agglutination indirect :

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

Une suspension d'*E.cuniculi* obtenue en culture cellulaire est mise à incuber dans le sérum de l'animal à tester, utilisée à diverses dilutions : quand c'est positif, les parasites qui ont fixés les anticorps de l'animal, se fixent à leur tour sur les billes imprégnées d'antiglobulines de lapin (préparé sur chèvre). Cette fixation est vérifiée au microscope : La bille est considérée positive si une ou plusieurs spores du parasite sont fixées sur elle. Il faut compter environ 500 billes et l'épreuve est considérée comme positive si le nombre de billes porteuses de spores est supérieur d'au moins 100 à celui qu'on obtient avec des parasites incubés en sérum témoin. (EUZEBY, 1987).

6. Avantages et inconvénients de la sérologie :

La détection sérologique des anticorps est la méthode de diagnostic la plus sensible durant les stades précoces de l'infection. Chez le lapin de laboratoire la séroconversion peut être démontrée au moins 2 semaines avant la détection des organismes intracellulaires et 4 semaines avant que les lésions histologiques dans le rein ou les parasites dans les urines ne soient retrouvés (COX et al, 1979). Quant aux lésions cérébrales, elles ne sont observées qu'environ 8 semaines après l'initiation de la réponse immunitaire sérique. La sérologie chez les animaux de laboratoire est raisonnablement utilisable, par contre chez les autres animaux, elle est controversée car on ne sait pas si le résultat positif est corrélé à une infection chronique, une infection passée, une infection sub-clinique, ou même, une réaction croisée avec une autre microsporidie. (DIDIER et al, 2000).

VII.1.1.2. Recherche des spores dans les liquides corporels :

L'excrétion des spores dans les urines peut être considérée le premier mode de dissémination d'*E. cuniculi*, elles peuvent être détectées 3-5 semaines après séroconversion, mais l'excrétion va décliner dans les mois suivants (COX et al., 1975). Puisque l'excrétion des spores prend place de façon sporadique dans les urines, un résultat négatif n'exclut pas l'infection parasitaire. La mise en évidence des parasites dans les fèces est discutée mais n'a pas pu être démontrée régulièrement (VON KUCKEN et al., 1987, HARCOURT BROWN et HOLLOWAY, 2003). Les méthodes de coloration les plus recommandées sont : la technique de WEBER (coloration de

trichrome modifiée) et l'utilisation d'un agent chimiofluorescent. La sensibilité est assurée variant entre 80% et 100% donc l'utilisation des deux méthodes en parallèle est conseillée pour optimiser la sensibilité surtout lorsque le nombre de spores est réduit. Le trichrome modifié emploie le chromotrope 2R, le vert lumière et l'acide phosphotungstique, les spores apparaissent en **rose** et le fond se colore en vert ou en bleu. Les agents chimiofluorescents (Calcofluor White, Uvitex 2B, Fungifluor...) font apparaître la microsporidie colorée en halo ovale turquoise vif sous une illumination ultraviolette.

VII.1.1.3.Biologie moléculaire :

Dans les urines et le LCR (Liquide Céphalo Rachidien), l'ADN peut être détectée par PCR au cours de l'excrétion.

VII.1.2.Le diagnostic complémentaire

- Une radiographie du crâne peut aider dans le diagnostic de l'otite mais ça peut conduire à de faux positifs/négatifs.
- Une étude récente a montré que l'analyse du liquide céphalo rachidien (LCR) peut porter support au diagnostic clinique de l'encephalitozoonose chez le lapin (JASS et al., 2008).
- Une Hypersensibilité cutanée est spécifique et il n'y a pas de réaction croisée, l'antigène utilisé est un broyat de spores (GEVREY, 1993). L'épreuve cutanée est de nature cellulaire : Intra-dermo réaction retardée, c'est-à-dire la lecture se fait à 24, 48 et 72h. Elle serait surtout positive en cas d'encephalitozoonose déclarée chez des sujets montrant des signes cliniques.

VIII.2. Post-mortem

L'examen en Microscopie optique et l'utilisation de colorants spécifiques peuvent aider le Pathologiste dans la détection de l'infection et la différenciation d'autres infections.

Il est également intéressant de multiplier le nombre de coupes car les lésions sont dispersées et peuvent ne pas apparaître sur certains échantillons (EROKSUZ et al, 1999).

L'analyse Histo-pathologique permet non seulement de mettre en évidence les spores mais aussi d'observer des lésions caractéristiques.

L'Encephalitozoonose du lapin est une maladie parasitaire due à *Encephalitozoon cuniculi* appartenant au phylum des Microspora qui sont des parasites intracellulaires générateurs de spores. Celles-ci sont de morphologie ovale et représentent la forme infectante et de résistance dans le milieu extérieur.

Le cycle parasitaire se déroule en trois phases : Infection, Différentiation et Prolifération, l'issue est l'excrétion des spores à partir de 30 jours post-infection dans les urines. La prévalence élevée est principalement liée aux conditions d'hygiène et mode de vie des animaux.

E.cuniculi provoque une maladie chronique qui n'aura d'effet que sur le gain de poids (diminution de 11%) ou une maladie clinique avec des symptômes nerveux (torticolis, paralysie...) dans la majorité des cas, couplés ou non à des atteintes rénales et oculaire. Ces signes sont accompagnés de lésions respectives : Méningo-Encéphalite, Néphrite interstitielle et uvéite phacoclastique.

La maladie aiguë clinique conduit souvent à la mort, elle est observée chez les animaux nouveau-nés et les adultes immunodéprimés. Quant à la maladie chronique, ses manifestations sont transitoires mais toutefois persistance de l'infection.

Le diagnostic définitif de la maladie du vivant de l'animal est difficile, il se base sur la sérologie (ELISA, IFI, CIA, ...) et la recherche des spores dans les liquides corporels, plus un diagnostic complémentaire comme une radiographie du crâne. Néanmoins, l'analyse Histo-pathologique permet non seulement de mettre en évidence les spores mais aussi d'observer des lésions caractéristiques.

ETUDE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

Le lapin est un animal sensible, Les troubles qui le menacent sont nombreux. Les principales pathologies dont il souffre sont : la myxomatose, la coccidiose, la gale sarcoptique, le coryza, les maux de pattes ... en addition des erreurs alimentaires et de gestion d'élevage. (BENMOUMA, 2011).

La pratique de la cuniculture en Algérie est ancienne, une première tentative a été réalisée en 1975, mais, sans succès, une seconde vers 1987 menée à un niveau rationnel. La promotion de cet élevage a bénéficié de l'apport de nouveaux moyens de production, tels que l'utilisation de lapins sélectionnés (Néo-Zélandais et Californiens), d'aliment granulé, de cages grillagées et d'un bâtiment (BERCHICHE et LEBAS, 1994). Mais, la difficulté de s'approvisionner en reproducteurs dû à la méconnaissance et la non maîtrise de la reproduction viennent entraver l'essor de cet élevage (BELHADI et al, 2002).

I. OBJECTIFS :

Notre premier objectif dans cette étude est d'identifier si l'Encephalitozoonose existe réellement chez le lapin en Algérie, et si c'est le cas quelles sont ses manifestations cliniques.

Nous avons voulu également explorer les moyens de diagnostic accessibles au laboratoire pour mettre en évidence le parasite : *Encephalitozoon cuniculi* comme l'Histo-pathologie. Enfin, nous voulions ouvrir une parenthèse concernant les maladies orphelines qui touchent les petits élevage, et peut-être motiver d'éventuelles études pour préserver la santé future des lapins.

II. MATERIEL ET METHODES :

II.1. Lieu des prélèvements :

L'a réalisation des prélèvements a eu lieu au niveau de l'ITELV (Institut Technique des Elevages)(Wilaya d'Alger) avec l'aide du Dr. ABBAD Hayat vétérinaire praticienne dans l'établissement. Cet Institut détient deux clapiers d'élevage de lapin

de population locale et souche synthétique. Les cadavres sont récoltés le premier jour de semaine entre le mois de janvier et le mois de mai 2017 et les autopsies sont réalisées au sein du laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'ENSV (Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire).

Un seul cas à part a été ramené à l'école par un éleveur pour le suivi de son cheptel afin d'identifier la cause de la mort de son animal et prévenir la contagion des autres individus.

II.2. Recueil des commémoratifs :

Sur un échantillon de 16 lapins nous n'avons autopsié que 9 sujets, nous justifions cela par manque de moyens de transport entre l'ITELV et l'ENSV, notre disponibilité au moment de la mort des animaux mais aussi le temps nécessaire pour procéder à toutes les étapes de notre recherche de l'autopsie et jusqu'à la confection des lames.

Un épisode de mortalité a été rapporté en juin 2016 chez ces mêmes lapins avec des symptômes évocateurs d'Encephalitozoonose, et ils ont été traités à l'Albendazole.

La mort de ces sujets est survenue aléatoirement donc l'échantillonnage est survenu au hasard. Seulement la souche synthétique a été concernée sauf un sujet ramené par un éleveur au niveau de l'ENSV. L'âge des lapins varie entre 1 et 6 mois, et les deux sexes sont inclus.

Les animaux sur lesquels l'étude a été portée sont élevés en cage, destinés après sevrage à la reproduction ou l'engraissement.

Ils sont nourris avec de l'aliment en granulé exclusivement (ONAB : Office National de l'Alimentation du Bétail), et vivent dans de bonnes conditions d'hygiène.

Concernant le volet prophylactique, ces lapins sont déparasités tous les six mois contre les parasites internes et externes avec une injection en sous cutané d'IVOMECA®. Les reproducteurs sont vaccinés contre l'entéro-toxémie par le vaccin COGLAVAX® vers l'âge de trois mois.

Les deux clapiers sont logés dans deux bâtiments d'élevage différents et l'accès consécutif aux bâtiments est interdit sauf en cas d'urgence ou de nécessité avec changement de tenue et de bottes.



Photo 01. Elevage en cage des lapins. (GHRIB N.H, 2017)

II.3. Nature des prélèvements :

Les lapins concernés par notre étude sont des animaux morts (cadavres) pour différentes causes (refroidissement, septicémie, cas sporadique..).

Le nombre total étant de 9 sujets dont 8 de la souche synthétique et 1 seul de la population locale parmi 16 sujets ; 5 males et 4 femelles avec une répartition d'âge comme suit :

- Population locale : 1 male d'1 mois.
- Souche synthétique : 2 males de 2 mois, 1 male et 1 femelle de 3 mois, 1 femelle de 4 mois, 2 femelles et 1 male de 6 mois.

La plupart des organes prélevés sont les reins et le cerveau. Parfois un prélèvement urinaire est possible quand la vessie est pleine.

II.3.1. Frottis urinaire :

C'est un outil de diagnostic clef lors de phase d'excrétion des spores, malheureusement il n'est pas toujours possible sur les cadavres lorsque la vessie est vide.

L'accès est très facile, juste après l'incision et l'ouverture du sujet on ponctionne la vessie avec une seringue stérile, la taille n'est pas importante vu que l'animal est déjà mort.

L'urine est ensuite collectée et soumise à une centrifugation (3500 tours par minutes pendant 10 minutes. Le surnageant jeté et le culot récupéré, pour être fixée ultérieurement avec de l'éthanol sur une lame en verre et colorée au May Grünwald Giemsa.

On prend une goutte du culot qu'on dépose sur une lame porte-objet et on l'étale à l'aide d'une deuxième lame. On laisse sécher dans l'étuve à 37°C ou à température ambiante. On l'imprègne ensuite le frottis avec de l'éthanol durant 5 minutes (Figure 2).

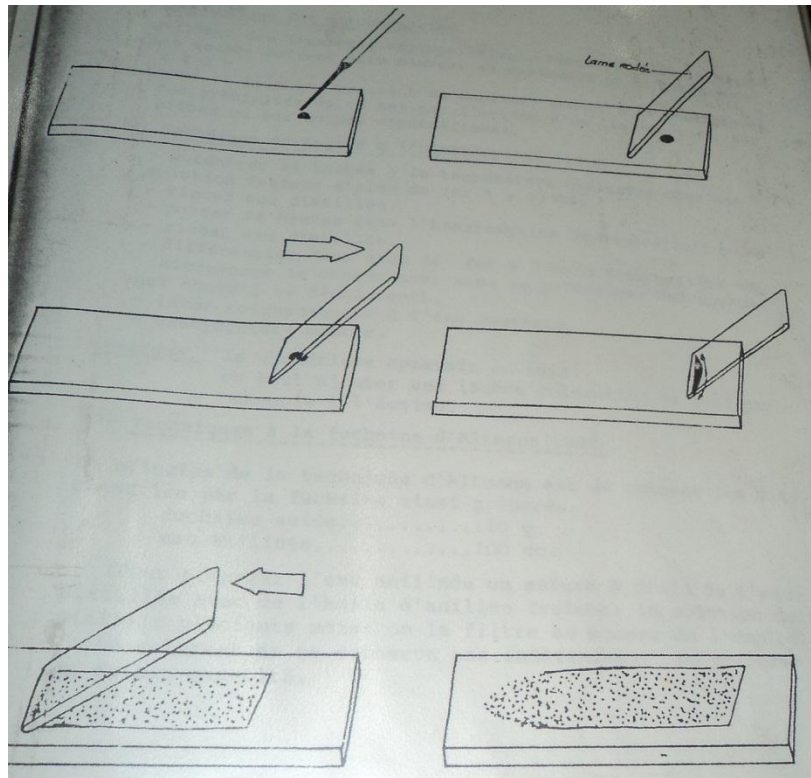


Photo 02. Confection d'un frottis urinaire. (LESBROS F.)

II.3.2. Autopsies :

Les cadavres sont désinfectés au niveau de l'abdomen. Une incision allant de la pointe du thorax jusqu'à l'anus est effectuée à l'aide d'une paire de ciseaux ou d'une lame de bistouris. Les organes abdominaux sont extraits, notamment les reins et la vessie. Le contenu de la vessie est aspiré à l'aide d'une seringue stérile.

Le cerveau est retiré de sa boîte crânienne après avoir incisé à l'aide de ciseaux de grande taille la base de la boîte crânienne (au niveau de la nuque).



Photo 03. Matériel de base d'une autopsie. (GHRIB N.H, 2017)

II.4. Réalisation et conservation des prélèvements :

Les organes sont prélevés suite à l'autopsie, ensuite on procède immédiatement à la Fixation qui est le conditionnement dans du Formol concentré à 10% pour une durée d'environ cinq jours dans des bocaux fermés hermétiquement.

Selon l'organe considéré, qu'il soit creux ou non, complexe ou simple, on réalise des sections incomplètes au bistouri chaque un centimètre afin de laisser pénétrer le liquide fixateur pour une meilleure conservation.

Le formol 10% est un liquide fixateur dilué par ajout d'eau distillée, un volume de formol du commerce (34% formaldéhyde) est combiné à 9 volumes d'eau distillée, sa vitesse de pénétration est de 1 à 2mm par heure et son délai de fixation minimum est de 12 heures dépendant de l'épaisseur de la pièce.

Pour les frottis urinaire il n'y a pas de conservation, la fixation sur lame à l'éthanol a lieu tout de suite après ponction, puis la coloration au May Grûnwald Giemsa.

II.5. Réalisation des lames Histologiques :

La confection de lames histologiques obéit à un processus méticuleux, qui nécessite du temps et un appareillage lourd, mais le résultat est satisfaisant.

Tout commence après la Fixation au formol qui durera un minimum de 24heures, avec une pince on procède organe par organe pour découper des portions de très petite taille. On monte notre bistouri et on fait des morceaux de 1cm de longueur/largeur et d'une épaisseur de 0.5cm.

Ces prélèvements sont déposés dans des cassettes en plastique colorées et identifiées au crayon, on peut déposer jusqu'à 2 ou 3 prélèvements par cassette du même organe.

Pour un organe complexe tel que le rein, on doit s'assurer que le plan de coupe du prélèvement va comprendre toutes les structures : corticale et médullaire.

La déshydratation prend place par des bains d'alcool successifs d'une durée de 1heure chacun, les bains sont ordonnés à concentrations croissantes comme suit : bain1 (alcool 60°), bain2 (alcool 70°), bain3 (alcool 90°), bain4 (alcool 95°), bain5 (alcool 100°), bain6 (alcool 100°), enfin on passe à 2 bains supplémentaires de Toluène d'une durée semblable.

Cette première étape est clôturée par la mise de toutes les cassettes préparées dans un bain de paraffine liquide au sein d'un Automate d'inclusion de paraffine à une température voisine à 56°C pendant 12 heures.



Photo 04. Découpage des prélèvements après un bain au Formol ; Alcool à différentes concentrations. (GHRIB N.H, 2017)

La deuxième étape constitue le blocage, on récupère les cassettes une par une qu'on ouvre, on élimine le couvercle et on garde le prélèvement dans la cassette respective qu'on va disposer dans un moule rectangulaire en acier ; on coule de la paraffine liquide dessus en couvrant la cassette. Au final, les moules sont déposés dans un Appareil de refroidissement qui va solidifier la paraffine en 20 à 30 minutes pour qu'on obtienne un bloc solide non friable, critère primordial pour passer à la suite du processus.

Une fois refroidit, on peut faire sortir les blocs des moules, on découpe le pourtour du prélèvement et on élimine l'excès de paraffine pour que la taille du prélèvement paraffiné coïncide avec la superficie de la lame qu'on utilisera plus tard.

Dans le cas où un bloc se détache de la cassette après refroidissement, on le remet dans le bain de paraffine liquide et on attend qu'il fonde, puis on refait le même procédé pour l'obtention d'un nouveau bloc solide.



Photo 05. Retrait des cassettes après un séjour en paraffine liquide. (GHRIB N.H, 2017)



Photo 06. Disposition des prélèvements dans les moules. (GHRIB N.H, 2017)



Photo 07. Automate d'inclusion de paraffine. (GHRIB N.H, 2017)



Photo 08. Ecoulement de paraffine liquide sur les blocs en moules. (Ghrib, 2017)



Photo 09. Appareil de refroidissement ; Refroidissement des blocs de paraffine et découpage. (GHRIB N.H, 2017)

La dernière étape avant la coloration, est la confection des lames proprement dite. Cela se passe au Microtome, il nous permettra d'avoir à la fin un ruban de paraffine d'une épaisseur de 7μ .

On aura besoin de deux rasoirs, un pour débarrasser l'excès de paraffine, l'autre pour dessiner le ruban. On installe notre cassette dans son emplacement et on règle le microtome à 10 ou 30μ d'épaisseur pour racler la paraffine jusqu'à ce qu'on observe la structure de prélèvement se dessiner sur le ruban. On change de rasoir, on remet le microtome à 7μ et on roule notre ruban. Dès qu'on a une belle coupe blanche avec une structure lisse sans déformation, on la découpe avec une lame ou un scalpel et on la plonge dans de l'eau albumineuse (la température est à 41°C).

On introduit une lame en verre neuve sous la coupe qui flotte sur l'eau, pour la coller dessus on essaye de la sortir verticalement et on voit la coupe s'y adhérer.

Afin de sécher, on dépose la lame sur une Platine chauffante pour quelques minutes avant de mettre la totalité des lames sur un porte-lame qu'on met à l'étuve réglée à 59°C , cela si on veut faire la coloration le jour même, sinon, on laisse sécher à température ambiante et on reprend le jour suivant.



Photo 10. Microtome ; Réglage de l'épaisseur du ruban de paraffine ; Roulement du ruban de paraffine. (GHRIB N.H, 2017)

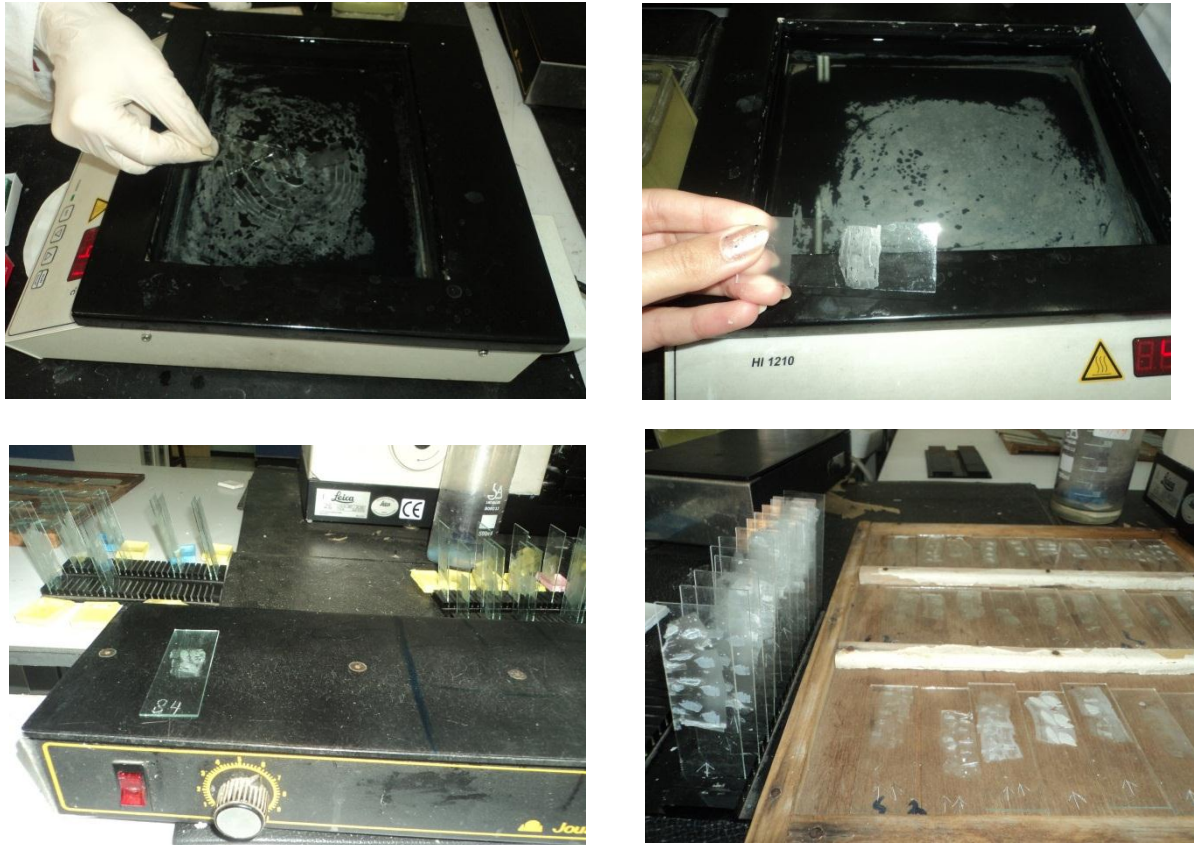


Photo 11. Confection des lames ; Séchage des lames. (GHRIB N.H, 2017)

II.6. Protocoles de Colorations :

Les protocoles de colorations sont variables et diversifiés, nous en avons choisis deux dans notre travail selon la disponibilité des réactifs, et bien sûr, selon la mise en valeur des structures histologiques, des contrastes et de la facilité de distinction entre celles-ci.

Nous nous sommes référés dans notre travail à l'ouvrage du Dr.LESBROS F : Technique de Fixation et de Coloration utilisées en microscopie optique.

II.6.1. Coloration Topographique Hemalun Eosine :

Principe : Coloration des noyaux par une laque aluminique l'Hemalun, et du fond par un seul colorant acide : l'éosine.

Réactifs :

- Hématoxyline de Harris.
- Eosine à 1.5%.

Mode opératoire : (voir Tableau VII).

II.6.2. Trichrome de Masson :

Principe : Tous les fixateurs habituels conviennent, éviter ceux qui contiennent du tetroxyde d'osmium.

Réactifs :

- Hématoxyline de Harris.
- Lithium de Carbonate (soluté saturé).
- Ponçeau (dissoudre 0.2 gr du Ponçeau dans 300ml d'eau distillée + 0.1gr de Fuchsine + 0.6ml d'Acide Acétique).
- Eau Acétifiée à 1%.
- Bleu d'Aniline (Vert Lumière ou Vert Solide : dissoudre 0.1 à 0.2gr de Bleu d'Aniline dans 100ml d'eau distillée + 0.2ml d'Acide Acétique).

Mode Opératoire : (voir tableau VII).

Tableau VII. Réactifs destinés à la préparation des coupes histologique

Hemalun Eosine	Trichrome de Masson
1. Déparaffiner : - Toluène 1 : 7min - Toluène 2 : 7min 2. Hydrater : - Alcool 100% : 1min - Alcool 90% : 1min - Alcool 70% : 1min - Eau distillée : 1min, 1min, 1min (3 bains) 3. Coloration : - Hématoxyline de Harris : 7min - Eau ammoniacale : 2min - Eau distillée : 1min	
- Eosine liquide : 10min	- Ponçeau : 10min - Eau acétifiée : 3min

	- Eau distillée : rinçage - Orange G-Acide Phosphomolybdique : 5min - Eau acétifiée : rinçage - Eau ditillée : lavage - Bleu d'Aniline : 30s - Eau distillée : 45s, 45s (2 bains)
4. Déshydrater : - Alcool 70% : 30s - Alcool 90% : 30s - Alcool 100% : 1min 5. Eclaircir : - Toluène 1 : 5min - Toluène 2 : 7min 6. Monter : - Résine (Eukitt)	

Pour le déparaffinage ou l'éclaircissement on peut utiliser deux bains de Xylène ou de Toluène.

Les colorants sont préparés préalablement et la durée de coloration dépendra de l'ancienneté de la préparation.

Le rinçage est le submergement des lames dans de l'eau distillée et le retrait immédiat, quant au lavage c'est le passage par plusieurs bains jusqu'à ce que l'eau devienne claire incolore.

II.6.3. Coloration au May Grûnwald Giemsa:

Principe : Cette technique met en œuvres deux colorants neutres :

- L'éosinate de bleu de méthylène en solution dans l'alcool méthylique (May-Grûnwald).
- L'éosinate d'azur de méthylène et le bleu de méthylène en solution dans un mélange à parties égales d'alcool méthylique et de glycérol (Giemsa).

Ces colorants en présence d'eau se dissocient en : éosine (anion) qui colore les éléments acidophiles, et en bleu et azur de bleu de méthylène (cations) qui colorent les éléments basophiles.

L'eau employée est tamponnée à un pH=6.8, optimale pour la coloration des éosinophiles.

Réactifs :

- Colorants de May-Grünwald et de Giemsa achetés dans le commerce.
- Tampon phosphate à $\text{pH}=6.8$.

Matériel :

- Une boîte de Laveran.
- une éprouvette de 20ml.
- des pipettes compte-gouttes.

Mode opératoire :

- Disposer les lames horizontalement sur le fond de la boîte de Laveran, les frottis vers le haut.
- Verser 10 à 15 goutte de solution de May-Grünwald pour recouvrir le frottis en totalité et fermer immédiatement la boîte (pour éviter l'évaporation). Laisser agir 3min.
- Préparer pendant ce temps la solution de Giemsa : Eau tamponnée 20ml + Solution de Giemsa 30gouttes.

Mettre d'abord l'eau dans l'éprouvette puis verser goutte à goutte le colorant de Giemsa sur la surface de l'eau, le mélange eau-colorant ne se fait que très partiellement et on obtient une phase aqueuse surmontée de colorant.

- Les 3 minutes écoulées, ajouter sur les frottis autant de gouttes d'eau tamponnée que l'on a déposé de gouttes de colorants.
- Agiter légèrement pour fixer le mélange, refermer et laisser agir 1min.
- Rejeter le colorant sans laver les lames, Rincer éventuellement la boîte.
- Retourner les lames puis les disposer obliquement sur le fond de la boîte, le frottis est alors incliné vers le bas.

Verser le contenu dans l'éprouvette, eau et colorant se mélange alors. La solution doit recouvrir complètement les lames. Laisser agir environs 25min.

- Sortir la lame du colorant. La rincer à l'eau neutre tamponnée. La laisser sécher verticalement sans chauffer.

III. RESULTATS :

III.1. Analyse des résultats par comparaisons des Différentes colorations :

Tableau VIII. Résultats des différentes colorations utilisées.

Organites	Lames Histologiques		Frottis Urinaire
	Hemalun Eosine	Trichrome de Masson	May-Grünwald Giemsa
Fonds	Roses (plusieurs tons)	-	-
Noyaux	Violet	Noir	Violet
Nucléoles	-	-	Bleu
Cytoplasmes	-	Rose ou brun (selon leur basophilie)	Bleu (basophile)
Hématies	-	Orange	Verdâtre
Grains de sécrétions	-	Rose	Violet (basophile) Orange (acidophile)
Kératine	-	Rose	-
Fibres de collagène et Mucus	-	Bleu	-

La technique de coloration à l'Hemalun Eosine qui a pour principe la coloration des noyaux par une l'Hemalun, et des fonds par un seul colorant l'éosine ne donnent pas des résultats aussi intéressants vu la difficulté de distinction entre les différentes structures histologique et la non mise en valeur des spores recherchées, comparée , au

Trichrome de Masson qui donne un meilleur contraste de couleurs et une coloration nette et bien distinguable des spores .

Au début, pour le premier échantillon on a pratiqué la coloration Hemalun Eosine pour le sujet N°1 puis après essai du Trichrome de Masson on a constaté que la lecture des lames est plus aisée, et ainsi on a adopté cette coloration pour la totalité restante des sujets.

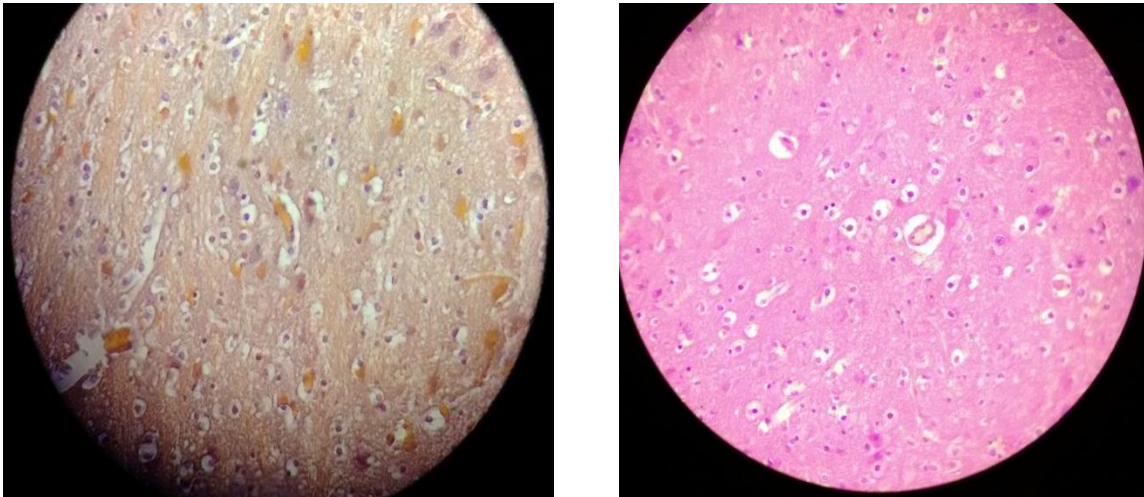


Photo 12. Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un cerveau de lapin (sujet N°1) au grossissement x40 ; Droite : Coloration avec Hemalun Eosine, spores colorées en Rose-Violet ; Gauche : Coloration avec Trichrome de Masson, spores colorées en Violet. (GHRIB N.H, 2017).

Selon le protocole qu'on aura suivi, la microsporidie va se colorer différemment :

- Elle sera faiblement colorable avec l'Hématoxyline Eosine (LEVINE N.D., 1985) et prendra une couleur Bleu Brillant par le May Grünwald Giemsa (INNES G.R.M et coll., 1962).
- Elle peut paraître en couleur Rose-Violet avec l'Hématoxyline Eosine, et Bleu au Giemsa (SCANZIANI E. et coll., 1985).

III.2. Analyse des résultats par comparaisons entre différents lapins :

Tableau IX. Tableau Récapitulatif des Lésions observés.

Lapins	Numéro de série du prélèvement	Identification de l'animal	Examen Histo-pathologique
1	N° 40	Male, 1mois, souche Locale.	Foyers de Nécroses Cérébrales. Infiltrations Hémorragiques. Identification de structures colorées en Rose-Violet à l'Hemalun Eosine et en Violet au Trichrome de Masson.
2	N° 52	Male, 3mois, souche synthétique.	Identification de structures arrondies colorées en Violet, regroupées au niveau du Foie.
3	N° 61	Femelle, 6mois, souche synthétique.	Identification des mêmes structures précédentes en Violet, isolées et accompagnées d'Hématies au niveau du Foie.
4	N° 67	Male, 2mois, souche synthétique.	Pas de Lésions évocatrices identifiées.
5	N° 67	Femelle, 6mois, souche synthétique.	Pas de Lésions évocatrices identifiées.
6	N° 67	Femelle, 4mois, souche synthétique.	Pas de Lésions évocatrices identifiées.
7	N° 67	Femelle, 3mois, souche synthétique.	Pas de Lésions évocatrices identifiées.
8	N° 71	Male, 6mois, souche synthétique.	Foyers de Nécroses Cérébrales. Identification des structures en Violet arrondies, regroupées ou isolées.
9	N° 71	Male, 2mois, souche synthétique.	Pas de Lésions évocatrices identifiées.

Sur un total du neuf sujets, on a pu observer des lésions évocatrices ou identifier des structures semblables à des spores d'*Encephalitozoon cuniculi*.

Les points en communs qu'on peut citer sont :

- Les spores sont regroupées ou isolées, ovalaires, parfois arrondies avec un noyau excentrique. (EUZEBY, 1987).
- Prennent une couleur au Bleu brillant (INNES et coll, 1962) ou Bleu (SCANZIANI et coll, 1985) au May Grünwald Giemsa.
- A l'Hemalun Eosine, les spores se colorent en Rose-Violet (SCANZIANI et coll, 1985).

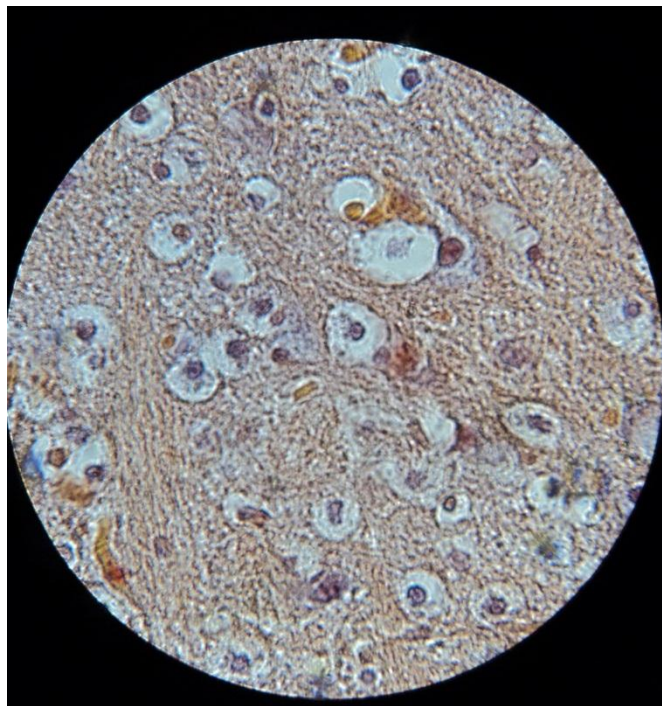


Photo 13. Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un cerveau de lapin (**sujet N°1**) au grossissement x100 ; Coloration avec Trichrome de Masson, spores colorées en Violets (GHRIB N.H, 2017).

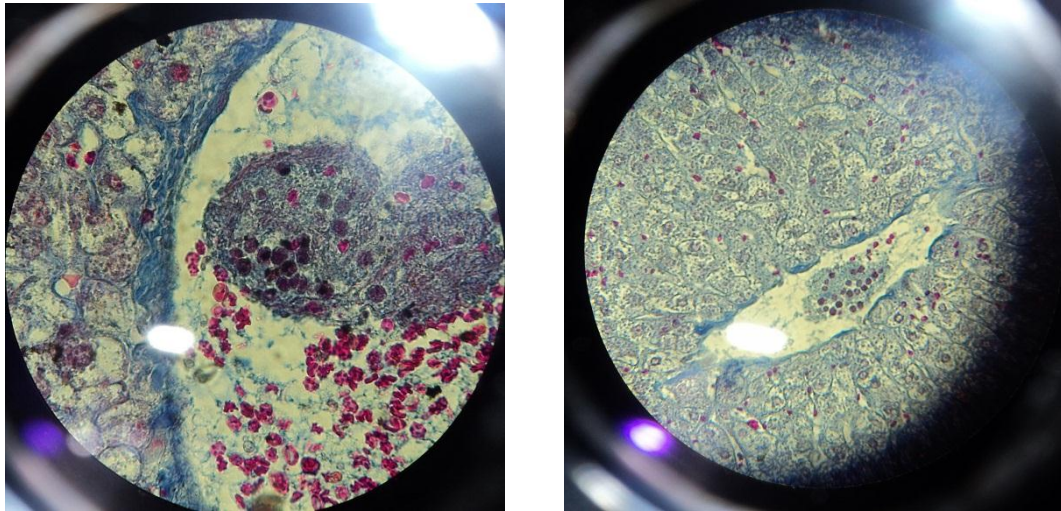


Photo 14 : Vue en Microscopie optique d'une coupe Histologique d'un foie de lapin (sujet N°2) ; Coloration avec Trichrome de Masson, spores colorées en **Violets** ; Droite : grossissement x40 ; Gauche : grossissement x100. (GHRIB N.H, 2017).

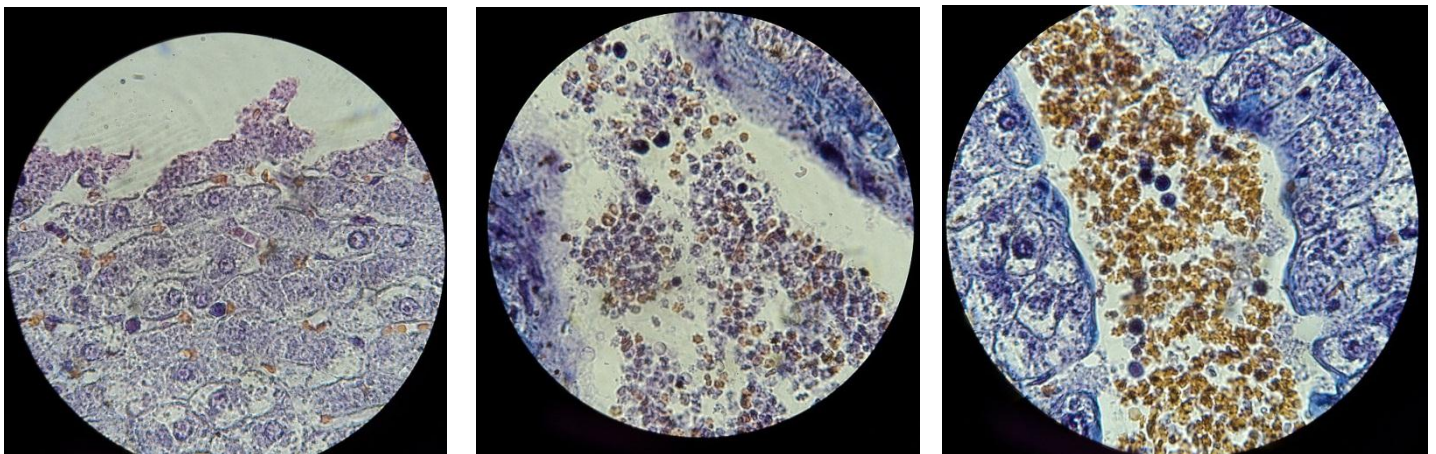


Photo 15 : Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un foie de lapin (sujet N°3) au grossissement x100 ; coloration au Trichrome de Masson, sores colorées en Violets. (GHRIB N.H, 2017).

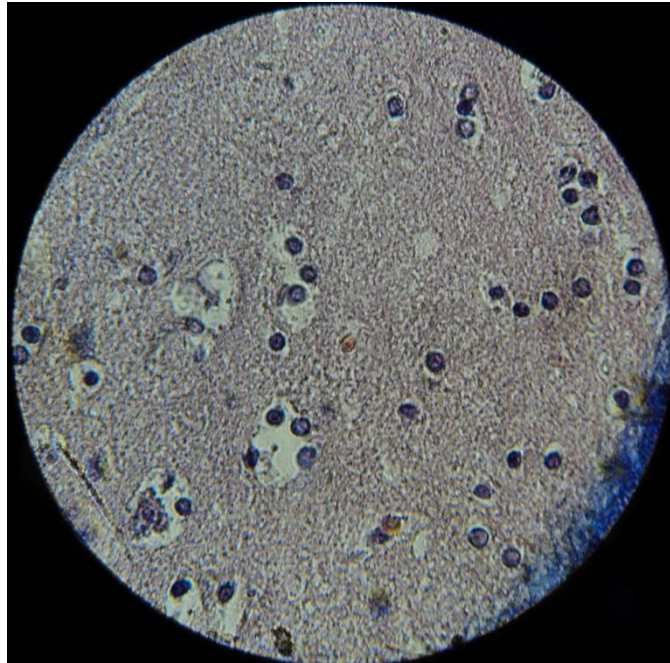


Photo 16 : Vue en microscopie optique d'une coupe Histologique d'un foie de lapin (sujet N°8) au grossissement x100 ; coloration au Trichrome de Masson, sores colorées en Violets. (GHRIB N.H, 2017).

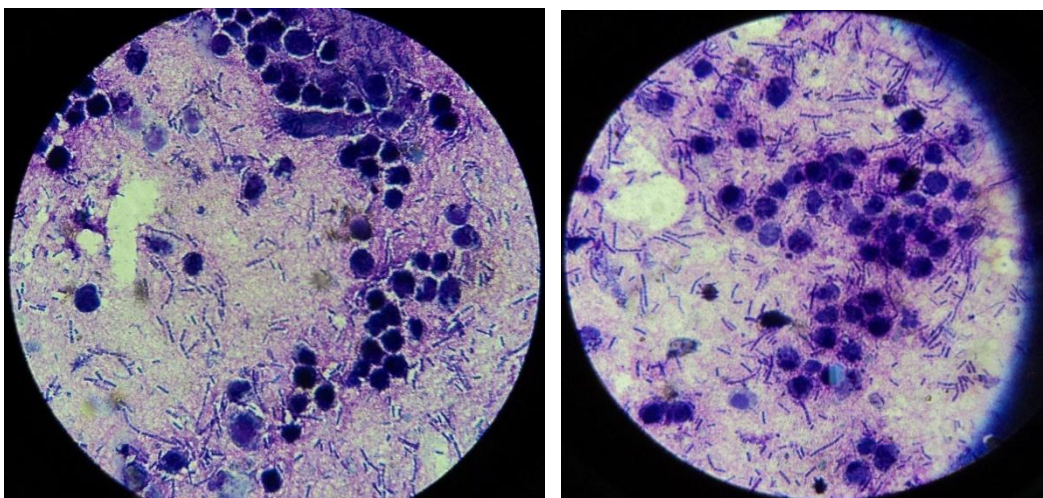


Photo 17 : Vue en microscopie optique d'un frottis urinaire avec coloration au May Grünwald Giemsa, spores colorées en Bleu Brillant. (GHRIB N.H, 2017).

IV. DISCUSSION :

IV.1. Etude Histo-pathologique des chercheurs et résultats obtenus :

Une étude faite sur 71 lapins en total (Tableau V) qui ont été euthanasiés ou morts, divisés en 3 groupes (CSOKAI et al., 2009) :

- Groupe 1 : Animaux manifestants des signes évocateurs de l'Encephalitozoonose = 33 individus.
- Groupe 2 : Animaux morts/euthanasiés pour d'autres raisons = 38 individus.
- Groupe 3 : Animaux témoins (control négatifs) dérivés de deux laboratoires.

Sur tous les animaux une nécropsie de routine a été réalisée. Pour les examens histologiques, des échantillons des tissus (cerveau, rein, foie, rate, intestin grêle, cœur, poumon, et excepté pour un animal, les yeux après extraction de la lentille) ont été fixés dans une solution de formaldéhyde 7%, bloqués dans de la paraffine et colorés à l'Hématoxyline Eosine (BÖCK, 1989).

Les changements histologiques du SNC et les reins ont été évalués et, à chaque fois que des lésions inflammatoires sont observées, des colorations spéciales pour le cerveau ont été également réalisées afin de détecter les spores.

Ces spores sont des acide-rapide par référence à Ziehl-Neelsen (HEINICKE et HÖHNE, 1971) et l'Acide-Rapide Trichrome (IGNATIUS et al, 1997).

Des échantillonnages aléatoires des reins ont aussi été colorés avec Ziehl-Neelsen. Les animaux sont considérés infectés avec *E.cuniculi* que si les spores sont détectées. Les changements histologiques ont été différenciés en Infiltration perivasculariale et granulomes.

- Parmi les 71 lapins examinés, les spores ont été détectées dans le cerveau chez 48 individus par les deux colorations.
- 39 de ces animaux ont montré une encéphalite non suppurative combinée à une néphrite interstitielle.
- 7 lapins ont montré une néphrite interstitielle sans lésions cérébrales.
- 2 lapins n'ont pas pu être évalués à cause d'une infiltration diffuse d'un lymphosarcome. Quoique, les spores ont été mises en évidence dans le cerveau.

- 1 autre lapin en addition des 48 précédents, qui était guéri d'un Désordre Vestibulaire Sans plut têt, a montré des lésions discrètes au niveau du cerveau, et une Néphrite interstitielle modérée même si les spores n'ont pas été détectées (ce lapin a été traité avec de Fenbendazole).

Parmi ces 49 lapins (48 positifs pour les spores et 1 avec des antécédents d'*Encephalitozoonose* et un traitement concomitant) 40 cerveaux et 48 reins ont été évalués. Les 22 lapins restants n'ont pas été testés pour les spores puisqu'ils n'ont pas montrés d'Encéphalite non suppurative.

- Ziehl-Neelsen a donné un résultat positif dans 93.9% des cas.
- Acide-Rapide Trichrome a donné une positivité de 85.7%.

Dans la plupart des cas, seulement quelques spores ont été détectées.

- Chez le Groupe 1 : 78.8% des lapins étaient infectés avec *E.cuniculi*.
- Quant au Groupe 2 : 57.9% ont manifestés des changements histologiques en plus de la présence de spores dans le cerveau et/ou le rein.

Pour ce qui on est des autres organes, toujours parmi les 49 lapins précédemment cités :

- 8 avec une infiltration inflammatoire non suppurative dans le poumon dont 2 cas associés à une inflammation granulomateuse.
- 9 ont eu une hépatite non suppurative dont une granulomateuse.
- 30 avec des infiltrations inflammatoires au niveau du cœur.
- 10 ont montré une uvéite non suppurative, et 1 cas d'uvéite phacoclastique. 1 autre lapin avec une cataracte unilatérale pendant que 2 autres avec une cataracte bilatérale. Enfin, 1 lapin a démontré une Nécrose focale des fibres de la lentille.

(CSOKAI et al., 2009)

IV.2. Etude Sérologique des chercheurs et résultats obtenus :

Une étude sérologique a été entreprise en Région Parisienne (BEAURIN, 2006) sur 124 lapins de compagnie qui ont subis un prélèvement sanguin. Ces lapins sont reçus par des Vétérinaire praticiens spécialisés dans les Nouveaux Animaux de Compagnie (NAC).

Les anticorps anti-*E.cuniculi* ont été mis en évidence par immunofluorescence et les sérums ont été soumis à des Dot-Blot sur protéines spécifiques d'*E.cuniculi* afin de comparer les différents tests.

69% des lapins se sont révélés séropositifs sans qu'aucun facteur, tant au niveau de la clinique que de l'âge ou du sexe, ne soit statistiquement associé à la séropositivité (BEAURIN, 2006).

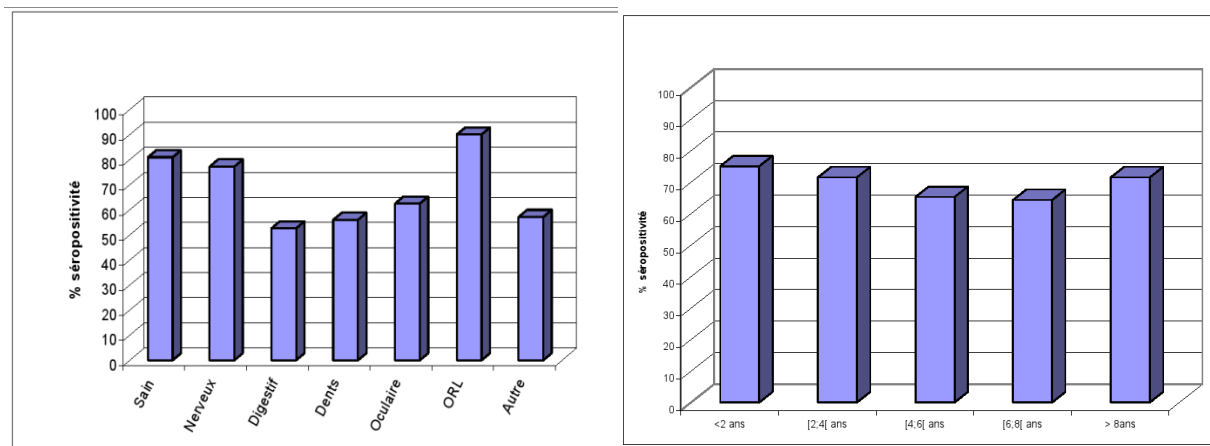


Figure 01. Droite : Répartitions des lapins séropositifs en fonction de leur âge (BEAURIN, 2006) ; **Gauche :** Répartitions des lapins séropositifs en fonction de la symptomatologie (BEAURIN, 2006).

IV.3. Choix de notre technique Histo-pathologique et Nos Résultats :

L'Histo-pathologie a été notre moyen de diagnostic abordé dans cette étude, car nous n'avons pas eu accès aux moyens sérologiques tels L'ELISA, et nous avons également travaillé sur des sujets morts (cadavres) d'où c'était la seule technique envisageable.

Par rapport au choix de nos sujets, nous avons préféré autopsier des lapins morts plutôt qu'euthanasier des animaux malades ou sains pour des raisons d'éthiques et de principes.

Quant à la sélection des organes, le cerveau et les reins sont les organes de prédilection cibles pour le parasite. Cependant pour amplifier les chances d'avoir des résultats positifs nous avons également récupéré le Foie.

En ce qui concerne les colorations, l'Hemalun Eosine est la coloration topographique basique disponible au niveau de tout laboratoire d'histopathologie, puis le Trichrome de Masson qui offre une plus large gamme de couleurs et des résultats appréciables.

Finalement, la lecture au microscope optique, du plus petit grossissement au plus grand, spécialement au grossissement x40 pour une vue globale des lésions, ensuite au x100 pour une identification des Spores.

Si on considère les lésions observées et les structures ovalaires ressemblant à des spores sur notre échantillon, on aura un 4/9 lapins atteints d'Encephalitozoonose.

Cela dit, nos résultats ne restent qu'Hypothétique par manque d'autres moyens de diagnostic de confirmation, et de manifestations cliniques rapportées aux lésions décrites, On va considérer que la totalité des résultats sont Négatifs et donc aucun des lapins n'est atteint d'Encephalitozoonose.

Les points critiques dans notre travail sont nombreux, liés principalement au manques de moyens :

- Une étude sérologique aurait été plus intéressante pour associer séropositivité et lésions histologique.
- Une récolte de commémoratifs et un suivie correcte des animaux étudiés, n'a malheureusement pas été possible dans le cas de lapins d'élevage plutôt que des lapins de compagnie.
- Un diagnostic histo-pathologique plus poussé au moyen de Microscopie Electronique pour une meilleure visualisation et une identification de certitude des spores.

L'objectif de notre étude a été de déterminer si la maladie existe en Algérie, pour cela nous avons voulu explorer les moyens de diagnostic disponibles au niveau de nos laboratoires : l'Histo-pathologie.

Sur un échantillon de 16 lapins en totalité, nous n'avons pu autopsier que 9 sujets. Nous avons réalisé un seul prélèvement urinaire coloré par la suite au May Grünwald Giemsa. Le prélèvement des organes a servi à la confection des lames histologiques ont été colorées à l'Hemalun Eosine et au Trichrome de Masson.

Notre étude semble être la première menée en Algérie (selon nos connaissances), Aucun lapin de l'échantillon étudié ne semble atteint d'Encephalitozoonose. Même si des structures semblables aux spores d'*Encephalitozoon cuniculi* ont été identifiées couplées à des lésions similaires à celles décrites en bibliographie chez 4 sujets sur 9.

Cette étude n'est pas en parfait accord avec celle publiée précédemment (CSOKAI et al, **2009**) mais cela n'exclut pas l'existence de la maladie en Algérie.

En effet, d'autres méthodes de diagnostic plus poussées auraient été intéressantes pour un diagnostic de certitude de la maladie comme la sérologie et la disposition d'un microscope électronique. De même, le suivie des animaux et l'observation des manifestations cliniques pour mieux orienter le diagnostic.

REFERENCES

1. **ASHTON N, COOK C, CLEGG F. 1976.** Encephalitozoonosis (Nosematosis) causing bilateral cataract in a rabbit. *Br J Ophthalmol.* **60**, 618-631.
2. **BANEUX PJR, POGNAN F. 2003.** In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Lab. Anim.* **37**, 132-138.
3. **BEAUVIS B, SARFATI C, CHALLIER S, DEROUIN F. 1994.** In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agent Chemother.* **38**, 10, 2440-2448.
4. **BEAURIN D. 2006.** Séroprévalence d'*Encephalitozoon cuniculi* chez le lapin de compagnie en région Parisienne. Thèse pour le DOCTORAT VÉTÉRINAIRE. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France.
5. **BENMOUMA N, YAHIA H, MESKINE R. 2001.** Guide d'élevage cunicole. Institut Technique des Elevages. Direction de la Formation, de la Recherche et de la Vulgarisation. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. République Algérienne Démocratique et Populaire. **12**.
6. **BÖCK P. 1989.** Mikroskopische Technik. Urban Schwarzenberg, Wein COX JC, **GALLICHIO HA. 1977.** An Evaluation of Indirect Immunofluorescence in the serological diagnosis of *Nosema cuniculi* infection. *Res Vet Sci.* **22** ; 50-52.
7. **BOOT R, HANSEN AK, HANSEK CK, NOZARI N, THUIS HCW. 2000.** Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals.* **34**, 3 ; 281-289.
8. **BRUGERE-PICOUX Jeanne. 1989.** Pathologies du lapin de compagnie et des rongeurs domestiques. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Paris.
9. **CHALUPSKY J, VAVRA J, GAUDIN JC, VANDEWALLE P, ARTHUR CP, GUENEZAN M, LAUNAY H. 1990.** Mise en évidence de la présence sérologique d'*Encephalitozoonose* et de *Toxoplasmose* chez le lapin de garenne (*oryctolagus cuniculus*) en France. *Bulletin de la société Française de parasitologie.* **8** (1), 91-95.
10. **CORNET M, ROMAND S, WARSZAWSKI J, BOURREE P. 1996.** Factors associated with microsporidial and cryptosporidial diarrhea in HIV infected patients. *Parasites.* **4**, 397-401.
11. **COX JC, PYE D. 1975.** Serodiagnosis of nosematosis by immunofluorescence using cell culture grown organisms. *Lab. Anim.* **9**, 297-304.

12. **COX JC, ROSS J. 1980.** A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. *Res Vet Sci.* 28, 396.
13. **CSOKAI J, GRUBER A, KUNZEL F, TICHY A, JOACHIM A. 2009.** *Encephalitozoonosis* in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) : pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitol Res.* 104, 629-635.
14. **CSOKAI J, JOACHIM A, GRUBER A, TICHY A, PAKOZDY A, KUNZEL F. 2009.** Diagnostic markers for *Encephalitozoonosis* in pet rabbits. *Vet Parasitol* 16, 18-26.
15. **DEPLAZES P, MATHIS A, BAUMGARTNER R, TANNER I, WEBER R. 1996.** Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin Infect Dis.* 22, 557-559.
16. **DEVERRIERE M. 2003.** Microsporidies communes à l'Homme et aux Animaux : étude Bibliographique. Thèse pour le DOCTORAT VÉTÉRINAIRE. Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France.
17. **DIDIER E, ORENSTEIN JM, ALDRAS A, BERTUCCI D, ROGERS LB, JANNEY A. 1995.** Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J CLIN Microbiol.* 33, 3138-3145.
18. **DIDIER ES, VOSSBRINCK CR, BAKER MD, ROGERS LB, BERTUCCI CD, SHADDUCK CA. 1995.** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* stains. *Parasitology.* 111, 411-421.
19. **DIDIER ES, DIDIER JD, SNOWDEN KF, SHADDUCK JA. 2000.** Microsporidies in mammals. *Microbes and Infection.* 2, 709-720.
20. **DIPINETO L, RINALDI L, SANTANIELLO A, SENSALÉ M, CUOMO A, CALABRIA M, MENNA LF, FIORETTI A. 2008.** Serological survey for antibodies for *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Italy. *Zoonoses Publ Health.* 55, 173-175.
21. **EBRECHT D, MULLER E. 2004.** Zoonosen des Kaninchens. *Tieraerztl Prax K.* 32, 363-369.
22. **EROKSUZ Y, EROKSUZ H, OZER H, CEVIK A, UNVER O. 1999.** A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elazığ, Turkey :

- Pathomorphologic and serologic (Crabonimmunoassay Test) Studies. Isr J Vet Med. 54, 73-77.
23. **EUZEBY J. 1987.** Protozoologie Médicale comparée. Les protozooses des animaux et leurs relations avec les protozooses de l'homme. Fondation MARCEL MERIEUX ED. 2, 34-72.
24. **EWINGMANN A, GOBEL T. 1999.** Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Encephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. Kleintierpraxis. 44, 357-372.
25. **FECHLE LM, SIGLER R. 2002.** Phacoemulsification for the management of Encephalitozoon cuniculi-induced phacoclasticuveitis in rabbits. Vet Ophthalmol. 5, 211-215.
26. **FLATT RE, JACKSON SJ. 1970.** Renal neoplasia in young rabbits. Path Vet. 7, 492-497.
27. **FRANK KUNZEL, ANJA JOACHIM. 2009.** Encephalitozoonosis in rabbits. University of Veterinary Medicine Vienna, Austria. 17 nov 2009, Springer-Verlag.
28. **FRANSEN FF, VAN KNAPEN F. 1995.** Susceptibility of Encephalitozoon cuniculi to several drugs in vitro, Antimicrob agents Chemother. 39, 1265-1268.
29. **GEVREY J. 1993.** Encephalitozoonose des carnivores domestique. Recueil de Médecine Vétérinaire. 169, 477-481.
30. **GIORDANO C, WEIGT A, VERCELLI A, RONDENA M, GRILLI G, GIUDICE C. 2005.** Immunohistochemical identification of encephalitozoon cuniculi in phacoclasticuveitis in four rabbits. Vet Ophthalmol. 8, 271-275.
31. **GRAHN B, WOLFER J, KELLER CH. 1991.** Diagnostic Ophthalmology. Can Vet J. 32, 372-373.
32. **GUTIERREZ YEZID. 2000.** Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations. Oxford University Press, New York. 2, 18-23.
33. **HALANOVA M, CISLAKOVA L, VALENCAKOVA A, BALENT P, ADAM J, TRAVNICEK M. 2003.** Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in human and animals in Eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med. 10 ; 1, 117-120.
34. **HARCOURT-BROWN F.M. 2004.** Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. Semin Avian Exot Pet Med. 13, 86-93.

35. **HEINICKE G, HÖHNE C. 1971.** Demonstration of tubercle bacilli in tissue sections with DMSO-containing dye solutions. *ZentralblAllgPathol.* 114 ; 15-19.
36. **HARCOURT-BROWN F.M, HOLLOWAY H.K.R. 2003.** Encephalitozoon cuniculi in pet rabbits. *Vet. Rec.* 152, 427-431.
37. **HOLLISTER W.S, CANNING E.U, VINEY M. 1989.** Prevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in stray dogs as determined by an ELISA. *Veterinary Record.* 124, 332-336.
38. **HOLLISTER W.S, CANNING E.U, WILLCOX A. 1991.** Evidence for widespread occurrence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology.* 102, 33-43.
39. **IGNATIUS R, LEHMANN N, MIKSITS K, REGNATH T, ARVAND M, ENGELMANN E, FUTH U, HAHN H, WAGNER J. 1997.** A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 35 ; 446-449.
40. **INNES J.R.M, ZEMAN W, FRENKL J.K, BORNER G. 1982.** Occult, endemic Encephalitozoonosis of the central nervous system of mice (Swiss-Bagg-O'Gradystain). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 21, 519-533.
41. **JASS A, MATIASSEK K, HENKE J, KUCHENHOFF H, HARTMANN K, FISCHER A. 2008.** Analysis of fibrospinal liquid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected Encephalitozoonosis. *Vet Rec.* 162, 19, 618-622.
42. **JORDAN CN, ZAJAC AM, LINDSAY DS. 2006.** Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *Compend Contin Educ Vet.* 28, 108-116.
43. **KEEBLE E.J, SHAW DJ. 2006.** Seroprevalence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 158, 539-544.
44. **KOUDELA B, VITOVEC J, KUCEROVA Z, DITRICH O, TRAVNICEK J. 1993.** The severe combined immunodeficient mouse as a model for Encephalitozoon cuniculi microsporidiosis. *Folia Parasitol (Praha).* 40,4, 279-286.
45. **KUNSTYR I, NAUMANN S. 1985.** Head tilt in rabbits caused by pasteurellosis and Encephalitozoonosis. *Lab Anim.* 19, 208-213.
46. **LAINSON R, GARNHAMR P.C.C, KILLICK-KENDRICK, BIRD R.G. 1964.** Nosematosis, a microsporidial infection of rodents and other animals, including men. *Br. Med. J.* 2, 470-472.

47. **LESBROS F.** Technique de FIXATION et de COLORATION utilisées en microscopie optique. Laboratoire d'Anatomie Pathologique de la faculté de Médecine de Lyon (Pr.FEROLDI J). Imprimerie des Beaux-Arts. S.A. J. TIXIER et fils. 69-Lyon 3^e.
48. **LEVADITI C, NICOLAU S, SCHOEN R. 1923. L'étiologie de l'encéphalite. C.R. 1977. :** HebdSeancesAcadSci., 985-988.
49. **LEVINE ND. 1985.** Microspora and Mixozoa. VeterinaryProtozoology. Iowa State UniversityPress Amer. 1, 329-333.
50. **LILY CHENG., 2006.** Parasites and Pestilence : infectious public health challenges. StanfordUniversity.
51. **LYNGSET A. 1980.** A survey of serumantibodies to *Encephalitozooncuniculi* in breedingrabbits and theiryoung. LabAnimSci. 30, 558-561.
52. **MARCATO PS, ROSMINI R. 1986.** Sistemnervoso In : MARCATO PS, ROSMINI R (eds) Patologiadelconiglio e dellalepre. Socieata Editrice Esculapio. Bologna, Italy. 201.
53. **MATHIS A, WEBER A, DEPLAZES P. 2005.** Zoonoticpotential of the microsporidia. Clin MicrobiolRev. 18, 423-445.
54. **MEYER-BRECKWOLDT A. 1996.** EpidemiologischeundklinischeUnterSuchungenzurEnzecephalitozoonosebeimZwergkaninchen. Dissertation, TierarHochsch, Hannover.
55. **NAST R, MIDDLETON DM, WHELER CL. 1996.** GeneralizedEncephalitozoonosis in a Jersey Woolyrabbit. Can Vet J. 37, 3030-307.
56. **NELSON J.B. 1962.** An intracellular parasite ressembling a Microsporidianassociatedwith ascites in Swissmice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 714-717.
57. **NEUSCHL J, CONKOVA E, KROKAVEC P, CELAROVA E, HALANOVA M, HIPIKOVA V, BALENT P, SUTIAK V. 1999.** The development of Encephalitozoonosis in rabbitsafter infection by Encephalitozoon cuniculi and treatmentwithAlbendazole. Acta Vet (Beogard) 49,4, 327-334.

58. **NEUWIRT E. 1988.** Ein Beitrag zur Diagnose der Encephalitozoonose (Nosematose) beim Kaninchen ; Vergleich zwischen direkten und indirekten Nachweismethoden . Dissertation, University of Munich.
59. **OKEWOLE EA. 2008.** Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi in domestic rabbits in Nigeria. *ONDERSTPOORT J. VetRes.* 75 ; 1, 33-38.
60. **PAKES SP, SHADDUCK JA, CALI A. 1975.** Fine Structure of Encephalitozoon cuniculi from rabbits, mice and hamsters. *J. Protozool.* 22, 481-488.
61. **PETRI M. 1969.** Studies on Nosema cuniculi found in transplantable ascites tumors with a survey of microsporidiosis in mammals, *Acta Pathol Microbiol Scand.* 204(suppl), 1-91.
62. **SANTANIELLO A, DIPINITO L, RINALDI L, MENNA LF, CRINGOLI G, FIORETTI A. 2003.** Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Res Vet Sci.* 87 ; 1, 67-69.
63. **SCANZIANI E, FINAZZI M, GALAZZI D. 1985.** Identificazione istologica di Encephalitozoon cuniculi e Toxoplasma gondii. *Riv. Zoot. Vet.* 13, 21-27.
64. **SCHMIDT E.C, SHADDUCK J.A. 1983.** Murine encephalitozoonosis model for studying the host parasite relationship of a chronic infection. *Infect. Immun.* 40, 936-946.
65. **SHADDUCK JA. 1980.** Effect of fumagillin on in vitro multiplication of Encephalitozoon cuniculi. *J Protozool.* 27, 2, 202-207.
66. **SHADDUCK JA, PAKES SP. 1971.** Encephalitozoonosis (Nosematosis) and Toxoplasmosis. *Am J Pathol.* 64, 3, 657-673.
67. **SNOWDEN K, LOGAN K, DIDIER ES. 1999.** Encephalitozoon cuniculi strain III is a cause of Encephalitozoonosis in both Humans and dogs. *Journal of infectious diseases.* 180, 6, 2086-2088.
68. **SNYDER SB, FOX JG, SOAVE OA. 1973.** Sub-clinical otitis media associated with Pasteurella multocida infections in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Anim Sci.* 23, 2, 270-272.
69. **STILES J, DIDIER E, RITCHIE B, GREENACRE C, WILLIS M, MARTIN C. 1997.** Encephalitozoon cuniculi in the lens of a rabbit with phacoclasticuveitis : Confirmation and treatment. *Vet Comp Ophthalmol.* 7, 233-238.

70. **SUTER C, MULLER-DOBLIES UU, HATT JM, DEPLAZES P. 2001.** Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with Fenbendazole. *Vet Rec.* 148, 478-480.
71. **THOMAS WB. 2000.** Vestibular dysfunction. *Vet Clin N Am : Small Anim Pract.* 30, 227-249.
72. **THOMAS C, FINN M, TWIGG L, DEPLAZES P, THOMPSON RC. 1997.** Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Aust Vet J.* 75, 11, 808-810.
73. **VON KUCKEN U, LUDWIG HJ, LANGE S, GUNTHER H, DIX B, LANGE M, MULLER D. 1987.** Eine generalisierte Erkrankung des Kaninchens durch *Encephalitozoon cuniculi*. *Mh Vet Med.* 42, 781-784.
74. **WALLER T. 1979.** Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Lab Anim.* 13, 93-97.
75. **WAWRZYNIAK I, BEAURIN D. 2006.** Séroprévalence d'*Encephalitozoon cuniculi* chez le lapin de compagnie en région Parisienne. Thèse pour le DOCTORAT VÉTÉRINAIRE. Communications personnelles à : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France.
76. **WEBER R, SCHWARTZ DA, DEPLAZES P. 1999.** Laboratory Diagnosis of Microsporidiosis. In : WITTNER M, WEISS LM (eds). *The Microsporidia and Microsporidiosis.* American Society for Microbiology, Washington DC. 315-362.
77. **WEISER J. 1965.** *Nosema muris* n.sp. A new microsporidian parasite of the white mouse (*Mus musculus*). *J. Protozool.* 12, 78-83.
78. **WILSON JM. 1979.** *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Res Vet Sci.* 26, 114.
79. **WOLFER J, GRAHN B, WILCOCK B, PERCY D. 1993.** Phacoclastic Uveitis in the rabbit. *Prog Vet Comp Ophthalmol.* 3, 92-97.
80. **WRIGHT JH, CRAIGHEAD EM. 1922.** Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med.* 36, 135-140.

Sites internet :

- (1) <http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Microsporidiosis/microsporidia1.html>
- (2) <https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/c/ce/He1.png/300px-He1.png>
- (3) http://d1uhp0uy75me04.cloudfront.net/mmah/2b/a054ed8056493fb2aacbf16b105a67/file/PV_28_02_108_f1.jpg
- (4) <https://www.studyblue.com/notes/n/intestinal-protozoan-parasites/deck/13936790>
- (5) <http://www.cdc.gov/dpdx/>
- (6) <https://www.samteddys39.fr/maladies/torticolis-et-encephalitozoonose-chez-le-lapin/>
- (7) http://www.medirabbit.com/FR/Neurologie/Signes/Cuniculi_signs_fr.html

Résumé :

L'Encephalitozoonose est une parasitose due à *Encephalitozoon cuniculi*. L'infection clinique engendre des signes évocateurs, cependant le diagnostic post-mortem reste un outil de diagnostic intéressant. Notre étude a porté sur l'exploration de moyens de diagnostic accessibles au laboratoire afin de déterminer si la maladie existe réellement en Algérie.

Nous avons travaillé sur des cadavres de lapin d'élevage récoltés de l'Institut Technique des Elevages (ITELV) entre Janvier et Mai 2017, sur un échantillon de 9 sujets sur 16, lesquels ont été autopsiés. Les organes : Reins, Cerveau, Foie ... ont servi à la confection des lames Histologiques pour un examen Histo-pathologique sous microscope optique et la mise en évidence des spores et des lésions évocatrices.

Malgré l'identification de spores semblables à celle décrites en bibliographie, en plus de lésions plus ou moins évocatrices chez 4 lapins, nous ne pouvons rapporter cela à l'Encephalitozoonose à cause du manque de commémoratifs et d'examens complémentaires mais aussi de l'insuffisance du grossissement au microscope optique.

Cependant, cela n'exclut pas l'existence de la maladie en Algérie mais c'est un premier travail réalisé sur le lapin qui devrait nous pousser à envisager d'autres moyens de diagnostic afin d'obtenir des résultats fiables comme la sérologie.

Mots clés : Encephalitozoonose, *Encephalitozoon cuniculi*, Lapin, rein, cerveau, foie, Microsporidie, Histopathologie.

Abstract :

Encephalitozoonosis is a parasitic infection caused by *Encephalitozoon cuniculi*. Clinical infection produces evocative signs, but post-mortem diagnosis remains an interesting diagnostic tool. Our study focused on exploring diagnostic facilities available in the laboratory to determine whether the disease actually exists in Algeria.

We worked on recovered rabbit corpses from the Technical Institute of Livestock (ITELV) between January and May 2017, on a sample of 9 subjects out of 16, which were autopsied. After this, the organs: kidneys, brain, liver, ... served for the preparation of histological slides in order to carry out an histo-pathological examination under the optical microscope to identify spores and evocative lesions.

Despite the identification of spores similar to those described in bibliography, in addition to more or less evocative lesions identified in 4 rabbits, we can't associate this to Encephalitozoonosis because of the lack of commemorative and complementary examinations but also of insufficient magnification under the optical microscope.

However, this does not exclude the existence of the disease in Algeria but it is a first work carried out on the rabbit that should push us to consider other means of diagnosis in order to obtain reliable results such as serology.

Key words: Encephalitozoonosis, *Encephalitozoon cuniculi*, rabbit, kidneys, brain, liver, Microsporidia, Histopathology.

ملخص:

مرض التهاب الدماغ هو عدوى ناجمة عن "إنسيفاليتوزون كونيكولي". الإصابة الصريحة تؤدي لظهور أعراض موحية بالمرض لكن التشخيص بعد الوفاة يبقى أداة مثيرة للاهتمام. قامت دراستنا بالتركيز على استكشاف مرافق التشخيص المتاحة في المختبر لتحديد ما إذا كان هذا المرض موجود فعلا في الجزائر

عملنا على جثث أرانب تم اقتناؤها من المعهد التقني لتربية الحيوانات ما بين جانفي و ماي 2017، تلخصت في عينة تتكون من 9 أفراد من بين 16 بالاجمال و التي تم تشريحها. بعد ذلك تم استخلاص الأعضاء (كلى، دماغ، كبد...) تصلح لإعداد شرائح نسيجية لإخضاعها لفحص نسيجي تحت المجهر الضوئي لتمييز الأوبوغ و التغيرات النسيجية الموحية بالمرض

على الرغم من تحديد أوبوغ مماثلة لتلك الموصوفة سابقا في المراجع، بالإضافة إلى التغيرات النسيجية لدى 4 أرانب ، إلا أنه لا يمكننا ربطها بمرض التهاب الدماغ بسبب عدم وجود الامتحانات المكملة للتشخيص، نقص في اقتناء المعلومات الكافية و كذا عدم توفر التكبير المناسب تحت المجهر الضوئي

ومع ذلك، فإن هذا لا يستثني وجود المرض في الجزائر ولكن هذا العمل هو الأول من نوعه على الأرنب و الذي ينبغي أن يدفعنا للنظر في وسائل التشخيص الأخرى من أجل الحصول على نتائج موثوقة مثل علم الأمصال

الكلمات المفتاحية: مرض التهاب الدماغ ، إنسيفاليتوزون كونيكولي، أرنب، كلى، دماغ، كبد، مكرويات الأوبوغ، علم الأنسجة