



**HAL**  
open science

**Rôle de l'interferon-gamma dans l'immunité cellulaire anti-microsporidienne. Etude du modèle de la souris déficiente pour le récepteur à l'interferon-gamma, infectée oralement avec la microsporidie Encephalitozoon intestinalis**

Nicolas Bouladoux

► **To cite this version:**

Nicolas Bouladoux. Rôle de l'interferon-gamma dans l'immunité cellulaire anti-microsporidienne. Etude du modèle de la souris déficiente pour le récepteur à l'interferon-gamma, infectée oralement avec la microsporidie Encephalitozoon intestinalis. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2003. Français. NNT : . tel-00003434

**HAL Id: tel-00003434**

**<https://theses.hal.science/tel-00003434>**

Submitted on 30 Sep 2003

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE  
PIERRE et MARIE CURIE (PARIS VI)**

**Spécialité Immunologie**

Présentée par

**Nicolas BOULADOUX**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE (PARIS VI)

**Rôle de l'interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dans l'immunité cellulaire anti-microsporidienne.**

**Etude du modèle de la souris déficiente pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$ ,  
infectée oralement avec la microsporidie *Encephalitozoon intestinalis*.**

Soutenue le 26 juin 2003

Devant le jury composé de :

Pr Dominique MAZIER

Dr Dominique BUZONI-GATEL

Pr Christian VIVARES

Pr Martin DANIS

Pr Jean DUPOUY-CAMET

Dr Isabelle DESPORTES-LIVAGE

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

*A mes parents, à ma sœur et à mon frère.*

*A la mémoire de ma cousine, Laurence.*

*"En essayant continuellement on finit par réussir.  
Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche."*

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Dominique Mazier de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche, et de m'avoir donné la possibilité de faire cette thèse en m'orientant vers le Docteur Isabelle Desportes-Livage. Je lui suis reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon jury.*

*Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Docteur Isabelle Desportes-Livage, qui a été ma directrice de thèse durant ces quatre dernières années. Je la remercie d'avoir relevé ce défi, de m'avoir laissé la liberté de développer mon sujet de recherche et de m'avoir donné la possibilité d'exposer mes travaux dans plusieurs congrès. Isabelle, merci pour votre confiance...*

*Je souhaite sincèrement remercier le Docteur Dominique Buzoni-Gatel et le Professeur Christian Vivarès, d'avoir accepté avec enthousiasme d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également les Professeurs Martin Danis et Jean Dupouy-Camet du temps et de l'intérêt qu'ils ont bien voulu consacrer à la lecture de ce manuscrit, et de l'honneur qu'ils m'ont fait d'en être les examinateurs.*

*Je ne remercierai jamais assez le Docteur Monique Lafon pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues malgré son emploi du temps chargé, pour ses encouragements et son soutien tout au long de cette thèse, mais aussi pour la liberté qu'elle m'a laissée au sein de son unité de recherche à l'institut Pasteur. Merci également à Mireille Lafage pour ses précieux conseils techniques, les nombreux services rendus, son amitié et son soutien dans les moments difficiles.*

*Je tiens à remercier également le Docteur Catherine Vaquero pour tout le temps qu'elle m'a consacré, me permettant d'avancer intelligemment dans mon travail de recherche. Merci Catherine pour ton esprit critique et tes remarques constructives !*

*Je voudrais tout particulièrement remercier Isabelle Raymond pour toute l'énergie qu'elle a consacrée à l'élevage et l'entretien de mes souris préférées,*

*malgré les nombreuses difficultés. Sans elle, une bonne partie de ce travail n'aurait pu se faire. Merci également à Maurel Tefit pour ses nombreux conseils et son aide précieuse lors de la manipulation des animaux.*

*Un grand merci et toute mon amitié à Maryse, notre secrétaire dévouée (trop ?) et notre seconde maman à tous, toujours prête à se démener contre les obstacles administratifs pour que nous puissions travailler dans les meilleures conditions.*

*Merci également à tous mes collègues devenus des amis, qui ont partagé chaque jour mes joies et mes déceptions inhérentes au travail de recherche. Merci à mon homonyme américain Nicolas, à Charlotte, Sylvie, Quentin, Philippe, Matthieu, Meryem et Dorothee pour tous les bons moments inoubliables que nous avons passé ensemble. Je tiens aussi à remercier certains amis extérieurs au laboratoire ou au milieu scientifique, qui ont aidé inconsciemment à faire aboutir ce travail. Un merci plus spécial à Frédéric, Nicolas et Steve... Sans vous tous je ne serais certainement pas allé au bout de cette thèse...*

*Merci à tous les autres membres de l'unité Inserm 511 qui m'ont transmis un peu ou beaucoup de leur savoir-faire, ou ont contribué de près ou de loin à l'avancement de cette thèse. Merci en particulier à Elianne, Anne, Josianne et Jean-François. Je tiens également à remercier mes collègues du service de parasitologie de la Pitié-Salpêtrière au pavillon Laveran, pour l'intérêt qu'ils ont manifesté vis-à-vis de mon travail, leur aide et leur gentillesse : merci à Sylvestre, Marc, Liliane et au Docteur Annick Datry.*

*Pour finir, je voudrais bien évidemment remercier tous les membres de ma famille. Je remercie tout spécialement mes parents, sans qui je n'aurais pu devenir ce que je suis... Merci pour leur soutien continu, leur confiance et leur patience. Merci également à ma sœur et à mon frère pour leurs encouragements et leur présence au cours de cette difficile période de rédaction. A tous, merci d'avoir supporté mes humeurs, mes doutes et d'avoir partagé mes joies et mes peines. Je vous aime...*

*Enfin à toutes celles et ceux que j'aurais pu oublier, merci mille fois !*

# Sommaire

<b>Liste des abréviations</b>	<b>1</b>
<b>Résumé</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>A- Microsporidies et microsporidioses</b>	<b>5</b>
A-1 Historique	5
A-2 Taxinomie	7
A-2.1 Classification	7
A-2.2 Phylogénie	10
A-3 Cycle parasitaire	13
A-3.1 La spore	13
A-3.2 L'infestation	14
A-3.3 La mérogonie	17
A-3.4 La sporogonie	19
A-4 Les microsporidioses humaines	20
A-4.1 Les genres <i>Pleistophora</i> et <i>Tracheipleistophora</i>	20
A-4.2 Le genre <i>Nosema</i>	21
A-4.3 Le genre <i>Vittaforma</i>	23
A-4.4 Le genre <i>Brachiola</i>	23
A-4.5 Le genre <i>Enterocytozoon</i>	24
A-4.6 Le genre <i>Encephalitozoon</i>	26
A-5 Les microsporidioses intestinales humaines	30
A-5.1 Manifestations cliniques	30
A-5.2 Epidémiologie et transmission	31
A-5.3 Diagnostic	34
A-5.3.1 La microscopie électronique	35
A-5.3.2 La microscopie optique	36
A-5.3.3 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux	37
A-5.3.4 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	38
A-5.4 Traitement	39
<b>B- L'immunité anti-microsporidienne</b>	<b>42</b>
B-1 L'immunité à médiation humorale	43
B-2 L'immunité à médiation cellulaire	45
B-2.1 Rôle des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et T CD8 <sup>+</sup>	46
B-2.2 Rôle des cytokines	48
B-2.3 Rôle de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup>	50
B-2.4 Rôle des cellules "natural killer" et des lymphocytes T TCRγδ <sup>+</sup>	50
B-2.4.1 Les cellules "natural killer" (NK)	51
B-2.4.2 Les lymphocytes T TCRγδ <sup>+</sup>	52
<b>C- Chimiokines et réponse immunitaire</b>	<b>53</b>
C-1 Définition et classification des chimiokines	53
C-2 Rôles des chimiokines dans la réponse immunitaire	57



<b>D- L'immunité de la muqueuse intestinale</b>	<b>60</b>
D-1 Les entérocytes	61
D-1.1 Les entérocytes, sources de chimiokines et de cytokines	61
D-1.2 Les entérocytes, cellules présentatrices d'antigènes	63
D-1.3 Rôle des entérocytes dans la réponse humorale intestinale	63
D-2 Les lymphocytes intraépithéliaux (LIEs)	64
D-2.1 Phénotype	65
D-2.2 Développement et origine des LIEs	67
D-2.3 Propriétés fonctionnelles des LIEs	69
D-2.4 Rôle des LIEs dans l'immunité anti-parasitaire	71
<b>OBJECTIFS</b>	<b>73</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>75</b>
<b>A- Culture cellulaire</b>	<b>75</b>
A-1 Les cellules RK13	75
A-2 Les entérocytes de la lignée Mode-K	75
A-2.1 Description de la lignée	75
A-2.2 Entretien de la lignée	76
<b>B- Production et purification des spores du parasite</b>	<b>76</b>
<b>C- Lignées murines</b>	<b>77</b>
C-1 Description des lignées utilisées	77
C-2 Protocole d'infection	78
<b>D- Histologie</b>	<b>79</b>
<b>E- Préparation de suspension de cellules lymphoïdes à partir d'organes ou de tissus</b>	<b>79</b>
E-1 Préparation des lymphocytes de la rate et des ganglions mésentériques	79
E-2 Purification des lymphocytes intraépithéliaux	80
<b>F- Cytométrie de flux (FACS)</b>	<b>81</b>
F-1 Analyse phénotypique des populations lymphocytaires	81
F-2 Détection des cytokines intracellulaires	82
<b>G- Méthodes d'extraction des acides nucléiques</b>	<b>83</b>
G-1 Extraction de l'ADN génomique	83
G-2 Extraction des ARN totaux	84
<b>H- PCR en temps réel ("<i>real-time PCR</i>")</b>	<b>86</b>
H-1 Principe de la technique	86
H-2 Quantification de la charge parasitaire	88
H-3 Quantification de l'expression des ARNm par PCR en temps réel après transcription inverse (RT-PCR)	90
H-3.1 Synthèse des ADNc	90
H-3.2 Quantification des ADNc par PCR en temps réel	91

<b>I- Test de cytotoxicité <i>in vitro</i></b>	<b>93</b>
I-1 Préparation, infection et marquage des macrophages péritonéaux	93
I-2 Séparation des lymphocytes intraépithéliaux CD8 $\alpha^+$	94
I-3 Mesure de la cytotoxicité	94
<b>J- Dosage des nitrites par la réaction de Griess</b>	<b>95</b>
<b>K- Analyse statistique des résultats</b>	<b>96</b>
<b>RÉSULTATS</b>	<b>97</b>
<b>A- Données parasitologiques et histologiques</b>	<b>98</b>
<b>B- Etude de la réponse immune cellulaire locale suite à l'infection orale par <i>Encephalitozoon intestinalis</i></b>	<b>102</b>
B-1 Evolution du nombre de lymphocytes intraépithéliaux et de leur phénotype	102
B-2 Activité cytotoxique <i>in vitro</i> des lymphocytes intraépithéliaux	106
B-3 Analyse de l'expression duodénale des ARNm spécifiques des cytokines et des chimiokines	108
ARTICLE : <i>Role of gamma interferon in cytokine and chemokine expression in the duodenum of mice after oral infection with the microsporidium Encephalitozoon intestinalis.</i>	110
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	144
<b>C- Etude de la réponse immune cellulaire au niveau systémique suite à l'infection orale par <i>Encephalitozoon intestinalis</i></b>	<b>147</b>
C-1 Analyse de la réponse immune cellulaire au niveau des ganglions mésentériques	147
C-1.1 Evolution du nombre de lymphocytes des ganglions mésentériques et de leur phénotype	147
C-1.2 Cinétique d'expression des ARNm spécifiques des cytokines au niveau des ganglions mésentériques	150
C-2 Analyse de la réponse immune cellulaire au niveau de la rate suite à l'infection orale avec <i>E. intestinalis</i>	152
C-2.1 Cinétique d'expression des cytokines au niveau de la rate	152

<b>Annexe n°2 : Effets de composés anti-mitotiques sur la multiplication et le développement d'<i>Encephalitozoon intestinalis</i> en culture cellulaire <i>in vitro</i></b>	<b>215</b>
ARTICLE : <i>In vitro activity of antimetabolic compounds against the microsporidian Encephalitozoon intestinalis.</i>	218
<b>Annexe n°3 : Mise au point d'une nouvelle méthode ELISA pour évaluer la multiplication des microsporidies en culture cellulaire <i>in vitro</i></b>	<b>221</b>
ARTICLE : <i>A new monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay to measure in vitro multiplication of the microsporidium Encephalitozoon intestinalis.</i>	223

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARNr</b>	ARN ribosomique
<b>BSA</b>	<i>"bovine serum albumin"</i> , albumine sérique bovine
<b>CD</b>	<i>"cluster of differentiation"</i> , marqueur de différenciation
<b>CMH</b>	complexe majeur d'histocompatibilité
<b>C<sub>T</sub></b>	<i>"cycle threshold"</i>
<b>DEPC</b>	diéthylpyrocarbonate
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>dNTPs</b>	desoxyribonucléotides tri-phosphate
<b>EDTA</b>	éthylène diamine tétra-acétate
<b>FITC</b>	<i>"fluorescein isothiocyanate"</i> , isothiocyanate de fluorescéine
<b>GALT</b>	<i>"gut-associated lymphoid tissue"</i> , tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal
<b>GAPDH</b>	glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
<b>IFN</b>	interféron
<b>Ig</b>	immunoglobuline
<b>IL</b>	interleukine
<b>iNOS</b>	<i>"inducible nitric oxide synthase"</i> , NO synthase inductible
<b>IP-10</b>	<i>"γ-interferon-inducible protein-10"</i>
<b>i-TAC</b>	<i>"interferon-inducible T cell α-chemoattractant"</i>
<b>LIEs</b>	lymphocytes intraépithéliaux
<b>LPS</b>	lipopolysaccharide
<b>MCP</b>	<i>"macrophage chemotactic peptide"</i>
<b>MIG</b>	<i>"monokine induced by γ-interferon"</i>
<b>MIP</b>	<i>"macrophage inflammatory protein"</i>
<b>Mpb</b>	million de paires de bases

<b>p.i.</b>	post-infection
<b>NK</b>	<i>"natural killer"</i> , cellule tueuse naturelle
<b>NO</b>	<i>"nitric oxide"</i> , oxyde nitrique
<b>PBS</b>	<i>"phosphate buffer saline"</i> , tampon phosphate salin
<b>PCR</b>	<i>"polymerase chain reaction"</i> , réaction de polymérisation en chaîne
<b>PE</b>	phycoérythrine
<b>RANTES</b>	<i>"regulated on activation normal T cell expressed and secreted"</i>
<b>RPMI</b>	milieu <i>"Roswell Park Memorial Institute"</i>
<b>RT</b>	<i>"reverse transcription"</i> , transcription inverse
<b>SCID</b>	<i>"severe combined immunodeficiency"</i> , déficit immunitaire combine sévère
<b>SIDA</b>	syndrome d'immunodéficience acquise
<b>SVF</b>	sérum de veau fœtal
<b>TCA</b>	<i>"T cell activation protein"</i>
<b>TCR</b>	<i>"T cell receptor"</i> , récepteur des cellules T pour l'antigène
<b>TNF</b>	<i>"tumour necrosis factor"</i> , facteur de nécrose des tumeurs
<b>VIH</b>	virus de l'immunodéficience humaine
<b>VIS</b>	virus de l'immunodéficience simienne

# *INTRODUCTION*

## A- Microsporidies et microsporidioses

### A-1 Historique

Les microsporidies sont des eucaryotes unicellulaires, parasites intracellulaires obligatoires, responsables chez l'hôte de pathologies appelées microsporidioses. Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, elles furent la cause d'épizooties qui contribuèrent à leur découverte. La plus importante, en raison de ses conséquences économiques sur l'industrie de la soie en Europe, fut la maladie du ver à soie ou pébrine. L'agent étiologique de cette maladie, *Nosema bombycis*, observé pour la première fois en 1857 par Nägeli, se développe dans l'intestin de la larve du ver à soie, puis se dissémine dans tous les organes, y compris les glandes séricigènes, rendant la larve incapable de tisser son cocon. En 1882, Balbiani proposa le terme de microsporidies (*Microsporidium*) pour désigner les parasites de type *Nosema*, en raison de la taille réduite des spores (quelques  $\mu\text{m}$ ) qui assurent leur dissémination (Balbiani, 1882).

Les microsporidies constituent aujourd'hui un groupe de parasites présents chez les animaux les plus divers, appartenant à toutes les classes de vertébrés (poissons, oiseaux, mammifères) ainsi qu'à différents groupes d'invertébrés tels que les mollusques, les arthropodes, les nématodes, les annélides, les cnidaires ou les myxosporidies (Canning et Lom, 1986; Wittner et Weiss, 1999; Didier et *al.*, 2000). Quelques espèces infectent également certains protistes unicellulaires libres (Ciliophora ou Ciliés) (Foissner et Foissner, 1995) ou parasites comme les grégaires (Apicomplexa) (Vivier, 1975). Bien que très répandus dans tout le règne animal, ces parasites sont surtout prépondérants chez les arthropodes, en particulier les insectes, et chez les poissons ; les microsporidies sont une cause d'épizooties aux

conséquences économiques parfois importantes dans les domaines de la sériciculture, de l'apiculture mais aussi en aquaculture (Becnel et Andreadis, 1999; Shaw et Kent, 1999). Chez les mammifères, la première infection causée par les microsporidies fut observée en 1922 chez des lapins atteints de paralysie (Wright et Craighead, 1922). L'examen du cerveau, de la moelle épinière et des reins révéla la présence d'un grand nombre de spores microsporidiennes, identifiées comme appartenant à une nouvelle espèce, *Encephalitozoon cuniculi* (Levaditi et al., 1923). Cette espèce, responsable d'encéphalites généralement associées à des néphrites, fut par la suite trouvée chez un grand nombre de mammifères, tels que les carnivores (renards), les rongeurs et les primates (Canning et Hollister, 1987; Didier et al., 1998; Desplazes et al., 2000; Didier et al., 2000). Plusieurs cas de microsporidioses ont aussi été décrits chez des animaux de laboratoire, des animaux domestiques (chiens, oiseaux) ainsi que des animaux de ferme (Snowden et al., 1998; Snowden et al., 1999; Wasson et Peper, 2000).

Chez l'homme, le premier cas documenté et confirmé d'infection microsporidienne fut décrit en 1959 chez un garçon âgé de 9 ans souffrant de fièvre, de vomissements, de maux de tête et de perte de connaissance (Matsubayashi et al., 1959). Auparavant, quelques publications firent état de microsporidioses humaines hypothétiques. Avant les années 1980, les microsporidioses sont rarement décrites chez l'homme et considérées comme des parasitoses accidentelles, le plus souvent consécutives à un déficit immunitaire transitoire ou irréversible du patient (Weber et al., 1994). Au début des années 1980, l'irruption et l'extension rapide du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) ont eu pour conséquence un accroissement du nombre de cas de microsporidioses humaines et la découverte d'espèces jusqu'alors inconnues. En 1985, Desportes et al. observèrent ainsi pour la première fois la présence d'une microsporidie chez un patient atteint du SIDA présentant une diarrhée chronique (microsporidiose intestinale); les caractéristiques de ce parasite permirent de créer un



nouveau genre et une nouvelle espèce de microsporidie : *Enterocytozoon bieneusi* (Desportes et al., 1985; Modigliani et al., 1985). Depuis, 9 autres nouvelles espèces ont été décrites chez des patients atteints du SIDA (Franzen et Muller, 2001) et plusieurs centaines de cas de microsporidioses chez des individus infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont été rapportés à travers le monde entier (Bryan et Schwartz, 1999). Les microsporidies sont aujourd'hui considérées comme des pathogènes responsables d'infections opportunistes principalement chez les patients atteints de SIDA (Kotler et Orenstein, 1998; Franzen et Muller, 2001), mais aussi chez d'autres individus immunocompromis non infectés par le VIH tels que les sujets sous traitement immunosuppresseur à la suite d'une transplantation d'organes (Rabodonirina et al., 1996; Guerard et al., 1999; Metge et al., 2000; Mohindra et al., 2002). Plus récemment, quelques cas de diarrhées dues à une microsporidiose ont été rapportés chez des sujets immunocompétents non infectés par le VIH (Bryan et al., 1997; Desportes-Livage et al., 1998; Raynaud et al., 1998).

## **A-2 Taxinomie**

### **A-2.1 Classification**

Les microsporidies appartiennent au Phylum des Microspora, qui comprend aujourd'hui près de 1300 espèces réparties en approximativement 150 genres (Larsson, 1999; Sprague et Becnel, 1999).

La taxinomie des microsporidies a beaucoup évolué depuis la première classification de ces parasites dans le groupe des "Microsporidies" par Balbiani en 1882. Les microsporidies furent d'abord classées par genres et par espèces sur la base de leur(s) hôte(s) naturel(s) et de leur cycle de vie, puis d'un certain nombre de critères ultrastructuraux tels que : la taille et la morphologie des différents stades de développement ; la configuration du ou des noyaux (noyau simple ou diplocaryon) dans les spores et les stades de développement intracellulaire ;

la configuration du filament polaire enroulé autour du noyau de la spore (nombre de tour de spires, spirale simple ou double) ; le mode de division nucléaire et cellulaire ; et les interactions cellule hôte-parasite durant le cycle de développement (Larsson, 1986). Jusqu'à récemment, la classification proposée par Sprague et Vávra en 1977 (réactualisée en 1982) demeurait la plus couramment utilisée (Tableau 1). Selon ce système de classification, les familles de microsporidies sont rassemblées en deux sous-ordres (Sprague et Vávra, 1977; Sprague, 1982) ; dans le sous-ordre des Pansporoblastina, les parasites élaborent une membrane qui isole les stades pré-sporaux ou sporoblastes du cytoplasme de la cellule hôte, alors qu'à l'inverse les sporoblastes sont formés en contact direct avec le cytoplasme dans le sous-ordre des Apansporoblastina (absence de membrane pansporoblastique).

En 1992, Sprague et *al.* ont proposé une révision du système de classification des microsporidies, dans laquelle les différences observées concernant l'organisation de l'appareil nucléaire et leurs implications lors du cycle nucléaire des chromosomes constituent les caractères taxinomiques les plus fondamentaux (Canning, 1988). Le phylum des Microspora est alors divisé en deux classes (Sprague et *al.*, 1992) : la classe des Dihaplophasea, qui rassemble les microsporidies dont les noyaux sont présents sous la forme d'un diplocaryon (deux noyaux étroitement associés et fonctionnant comme une seule unité) dans certaines phases de leur cycle parasitaire ; et la classe des Haplophasea, dans laquelle les microsporidies ont des noyaux simples durant tout le cycle de développement (Tableau 2). Les espèces appartenant à la classe des Haplophasea sont présumées en haplophase tout au long du cycle et sont donc considérées comme haploïdes. De plus, le processus de méiose est observé uniquement chez les espèces incluses dans les Dihaplophasea.

**TABLEAU 1 : Classification des microsporidies infectant l'homme proposée par Sprague et Vávra en 1977.**

PHYLUM : MICROSPORA			
Classe : Microsporea			
Ordre	Sous-Ordre	Famille	Genre
Minisporida	<i>(N'infectent pas l'Homme)</i>		
Microsporida	Pansporoblastina	Glugeidae	<i>Pleistophora</i> <i>Trachipleistophora</i>
	Apansporoblastina	Unikaryonidae	<i>Encephalitozoon</i> <i>Enterocytozoon</i>
		Nosematidae	<i>Nosema</i>
		Non classé	<i>Microsporidium</i>

Nota bene : Le genre *Enterocytozoon* est actuellement classé dans la famille des *Enterocytozoonidae*.

**TABLEAU 2 : Révision de la classification des microsporidies infectant l'homme, proposée par Sprague et *al.* en 1992.**

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

Aujourd'hui, l'examen ultrastructural des microsporidies ne suffit plus pour distinguer les différentes espèces entre elles, mais aussi pour étudier les relations phylogénétiques entre les différents genres. De plus, les premières données issues de la biologie moléculaire remettent en question la position taxinomique de certains genres et de certaines espèces de microsporidies et donc la classification existante. L'analyse comparative des séquences codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) a ainsi montré que certaines microsporidies (*Nosema bombycis* et *Nosema tichoplusiae*) considérées comme appartenant à des espèces différentes étaient en fait synonymes (Pieniazek et al., 1996), tandis qu'elle a confirmée que d'autres (*Encephalitozoon hellem* et *Encephalitozoon intestinalis*) étaient bien distinctes (Zhu et al., 1994). L'analyse moléculaire des gènes codant pour les ARNr ouvre également de nouvelles perspectives quant à la position des microsporidies dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes.

### **A-2.2 Phylogénie**

Les microsporidies sont des organismes eucaryotes comme le soulignent la présence d'un noyau délimité par une membrane nucléaire, l'existence d'un système membranaire intracytoplasmique (Takvorian et Cali, 1994), la différenciation d'un fuseau mitotique lors de la séparation des chromosomes au cours de la mitose (Canning, 1988) et la polyadénylation des ARNm (Weiss et Vossbrinck, 1998). Ces parasites sont néanmoins considérés comme des eucaryotes primitifs du fait de l'organisation atypique de leur appareil de Golgi et de l'absence de mitochondries et de tout autre organite source d'énergie (peroxysomes ou hydrogénosomes) à tous les stades de développement, ce qui explique leur localisation intracellulaire obligatoire (Cavalier-Smith, 1987). Par ailleurs, les microsporidies possèdent certains caractères spécifiques des organismes procaryotes notamment : la taille des ribosomes (70S) et des sous-unités ribosomales (50S+30S), la taille des ARNr (23S et 16S)

mais aussi l'absence d'ARN 5,8S (Ishihara et Hayashi, 1968; Cury et *al.*, 1980; Vossbrinck et Woese, 1986). La séquence de l'ARNr de la petite sous-unité des ribosomes microsporidiens (ARNr 16S) présente non seulement un faible pourcentage d'identité avec celle de l'ARNr 18S des autres organismes eucaryotes, mais est également plus courte que la séquence de l'ARNr de la petite sous-unité des eucaryotes et des procaryotes (Vossbrinck et *al.*, 1987; Weiss et Vossbrinck, 1998). L'ensemble de ces observations a permis d'émettre l'hypothèse d'une divergence très précoce des microsporidies dans l'histoire évolutive des eucaryotes, les situant à la base de l'arbre phylogénétique de ces-derniers. Cette hypothèse semble être confirmée par la simplicité de la structure secondaire de l'ARNr 16S des microsporidies (Hartskeerl et *al.*, 1993) et par le fait que les génomes d'*Encephalitozoon cuniculi* et *Encephalitozoon intestinalis* constituent à ce jour les plus petits génomes (respectivement 2,9 et 2,3 Mpb) rapportés chez un organisme eucaryote (Biderre et *al.*, 1995; Méténier et Vivarès, 2001).

Cependant, plusieurs études remettent en question la position ancestrale des microsporidies. Ainsi, la comparaison des séquences des gènes codant pour l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -tubuline suggère l'existence d'une relation étroite entre les microsporidies et les champignons, et souligne l'absence de relation avec les autres groupes d'organismes dépourvus de mitochondries, comme les diplomonades et les trichomonades (Edlind et *al.*, 1996; Keeling et Doolittle, 1996; Keeling et McFadden, 1998; Keeling et *al.*, 2000; Keeling, 2003). De plus, les microsporidies partagent avec les champignons diverses particularités, comme la présence de chitine et de tréhalose dans la spore et l'existence de stades diplocaryotiques ou dicaryotiques au cours du cycle de vie. Certaines similitudes sont également observées entre les champignons et les microsporidies lors des processus de mitose (persistance de la membrane nucléaire, différenciation d'un fuseau mitotique intranucléaire dépourvu de centrioles) et de méïose (Canning, 1988; Flegel et Pasharawipas, 1995; Bigliardi et *al.*, 1998). Les

résultats des phylogénies moléculaires basées sur le gène de l'ARNr 23S (Peyretailade et al., 1998a) ou sur différentes protéines (facteurs d'élongation EF-1 $\alpha$  et EF-2, protéine de liaison à la boîte TATA, grande sous-unité de l'ARN polymérase II) renforcent l'hypothèse d'un positionnement phylogénétique des microsporidies au sein des champignons ou comme un groupe frère de ces-derniers (Kamaishi et al., 1996; Fast et al., 1999; Hirt et al., 1999; Van de Peer et al., 2000). Plus récemment, l'utilisation de données issues du séquençage complet du génome d'*Encephalitozoon cuniculi* a permis de conforter cette hypothèse (Katinka et al., 2001).

Par ailleurs, des séquences codant pour diverses protéines d'origine mitochondriale ont été identifiées chez plusieurs microsporidies (Weiss et Vossbrinck, 1998; Fast et Keeling, 2001) ; c'est le cas notamment du gène codant pour une protéine appartenant à la classe des protéines chaperones ou "*heat-shock protein*" HSP70. L'analyse phylogénétique indique une parenté très proche entre les protéines HSP70 des microsporidies et les protéines HSP70 mitochondriales des champignons, en particulier les levures (Germot et al., 1997; Hirt et al., 1997; Peyretailade et al., 1998b). La présence de ces gènes démontre clairement que les microsporidies sont issues d'un ancêtre eucaryote qui était pourvu de mitochondries. De plus, une étude récente a permis de mettre en évidence chez la microsporidie *Trachipleistophora hominis* des organelles considérées comme les vestiges d'anciennes mitochondries (Williams et al., 2002). Toutes ces observations appuient l'hypothèse, déjà formulée en 1980, selon laquelle l'absence de mitochondries, de peroxyosomes et les propriétés procaryotes des ribosomes seraient chez les microsporidies des caractères secondaires, reflétant une adaptation extrême à la vie parasitaire intracellulaire stricte (Cury et al., 1980). Bien que la nature exacte des relations phylogénétiques entre les microsporidies et les champignons reste à clarifier, les microsporidies ne sont plus aujourd'hui considérées comme des eucaryotes primitifs, mais

plutôt comme un groupe d'organismes très évolués et spécialisés, apparentés aux champignons (Müller, 1997; Keeling et McFadden, 1998; Keeling et Fast, 2002; Keeling, 2003).

### **A-3 Cycle parasitaire**

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

#### **A-3.1 La spore**

Unique stade extracellulaire, la spore constitue la forme de développement la plus caractéristique des microsporidies. Sa morphologie (taille, forme) varie selon les espèces, mais aussi parfois au sein d'une même espèce ; certaines microsporidies présentent ainsi différents types de spores selon le stade de leur cycle de vie. Ovoïdes, ellipsoïdes ou piriformes chez la plupart des microsporidies, les spores peuvent aussi avoir l'aspect de baguettes ou de bâtonnets. Chez les espèces pathogènes pour l'homme, elles mesurent entre 1 µm pour les plus petites (*Enterocytozoon bieneusi*) et 5 µm pour les plus grandes (*Nosema ocularum*).

L'organisation de la spore est identique chez toutes les microsporidies (Figure 1). La spore est une cellule hautement spécialisée, dont la membrane plasmique est entourée d'une endospore et d'une exospore formant une paroi rigide. L'exospore, dense aux électrons, constitue la couche externe de la paroi et possède une structure très complexe de nature protéique (Bigliardi et *al.*, 1996; Bigliardi et Sacchi, 2001). L'endospore, riche en chitine, est en contact direct avec la membrane plasmique de la spore ; son épaisseur est uniforme sur toute

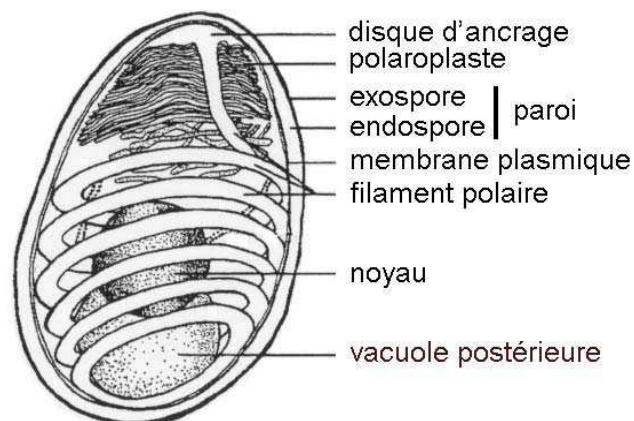
sa surface, excepté au niveau de l'apex (pôle antérieur) de la spore, où l'endospore est plus fine (Vavra et Larsson, 1999). La membrane plasmique délimite le contenu de la spore, à savoir le sporoplasme infectieux et l'appareil d'extrusion permettant l'infestation de la cellule hôte. Ce dernier est composé du polaroplaste, de la vacuole postérieure et du filament (ou tube) polaire, structure la plus caractéristique de la spore microsporidienne. La partie antérieure rigide et rectiligne du filament polaire est associée au disque d'ancrage, localisé sous la paroi à l'apex de la spore. Dans sa portion postérieure, le tube polaire s'enroule autour du sporoplasme et de la vacuole postérieure pour former plusieurs boucles, dont le nombre et l'arrangement (répartition en un ou deux rangs en coupe transversale) varient selon l'espèce et le genre de microsporidie (Sprague et *al.*, 1992; Vavra et Larsson, 1999). Son diamètre peut être constant sur toute sa longueur ou variable. Des études récentes ont permis d'isoler et de caractériser les principales protéines associées au filament polaire (Delbac et *al.*, 1998; Keohane et *al.*, 1998; Keohane et Weiss, 1999; Weiss, 2001). Le polaroplaste désigne un ensemble organisé de membranes occupant la partie antérieure de la spore. Il comprend le polaroplaste vésiculaire, localisé dans la région médiane de la spore, et le polaroplaste lamellaire, formé de saccules membranaires aplatis qui entourent la portion rectiligne du filament polaire. Le reste de la spore est occupé par le sporoplasme, à savoir le noyau et le cytoplasme riche en ribosomes. Le noyau est unique ou présent sous la forme d'un diplocaryon (deux noyaux étroitement associés et fonctionnant comme une seule unité) selon les espèces.

### **A-3.2 L'infestation**

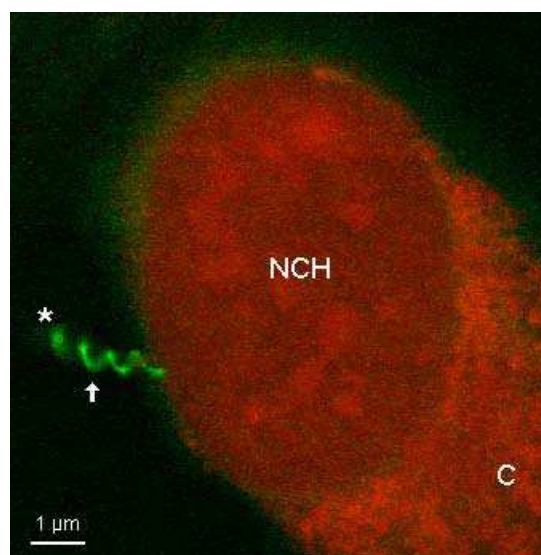
L'infestation d'une cellule hôte par les microsporidies est un phénomène qui reste encore assez mal caractérisé. Ce processus extrêmement rapide (moins de deux secondes *in vitro*) comprend l'activation de la spore puis la décharge du tube polaire permettant l'injection



du sporoplasme infectieux à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte (Figure 2) (Frixione et al., 1992).



**FIGURE 1 : Organisation typique de la spore microsporidienne.** La configuration du filament polaire (nombre de tour de spires, spirale simple ou double) varie selon l'espèce de microsporidie. (d'après Franzen et Müller, 1999)



**FIGURE 2 : Observation en microscopie confocale du filament polaire d'*E. intestinalis* dans une culture de cellules RK13 infectées.** La détection du filament polaire est réalisée en immunofluorescence indirecte grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal (M<sub>3</sub>.3B8) dirigé contre une protéine du tube polaire. NCH, noyau de la cellule hôte ; C, cytoplasme de la cellule hôte ; \*, spore (non visible).

La nature des stimuli provoquant l'activation puis la germination de la spore est très variable selon les espèces, reflétant sans doute l'adaptation des microsporidies à leur hôte et à leur environnement extérieur (Undeen et Epsky, 1990). *In vitro*, la germination des spores peut ainsi être induite par un très grand nombre de stimuli physiques ou chimiques tels que : la présence de divers anions ou cations, des variations du pH du milieu extérieur, des conditions hyperosmotiques, une déshydratation suivie d'une réhydratation ou bien encore l'exposition aux ultraviolets (Keohane et Weiss, 1999). Quelque soit le stimulus impliqué, l'activation de la spore se traduit toujours par une augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de celle-ci, s'accompagnant d'un afflux d'eau qui a pour conséquence un gonflement du polaroplaste et de la vacuole postérieure (Undeen et Epsky, 1990; Undeen et Frixione, 1990). La structure complexe de la paroi de la spore fournit la résistance nécessaire pour permettre le maintien de la pression osmotique à un niveau élevée. Selon Undeen et *al.*, l'augmentation de la pression osmotique au cours de l'activation de la spore est générée par la dégradation du tréhalose en monomère de glucose sous l'action de la tréhalase (Undeen, 1990; Undeen et Vander Meer, 1994; Undeen et Vander Meer, 1999). Une autre hypothèse suggère un rôle important des ions calcium  $Ca^{2+}$ ; la désorganisation des systèmes membranaires au cours de l'activation de la spore entraînerait la libération d'ions  $Ca^{2+}$  dans le sporoplasme, responsable d'un afflux d'eau et de l'augmentation de la pression osmotique (Keohane et Weiss, 1998; Weidner et *al.*, 1999). Les ions  $Ca^{2+}$  pourraient également interagir avec les composants du cytosquelette de la spore et induire l'activation d'enzymes tels que la tréhalase. Le gonflement du polaroplaste entraîne la rupture du disque d'ancrage et déclenche l'émergence du filament polaire au niveau de l'apex de la spore, là où la paroi est la plus fine (Keeling et Fast, 2002). Au cours de sa décharge, le tube polaire progresse à l'extérieur de la spore grâce à la polymérisation des protéines qui le constituent, et se réorganise pour former un tube cylindrique creux (Keohane et Weiss, 1999).

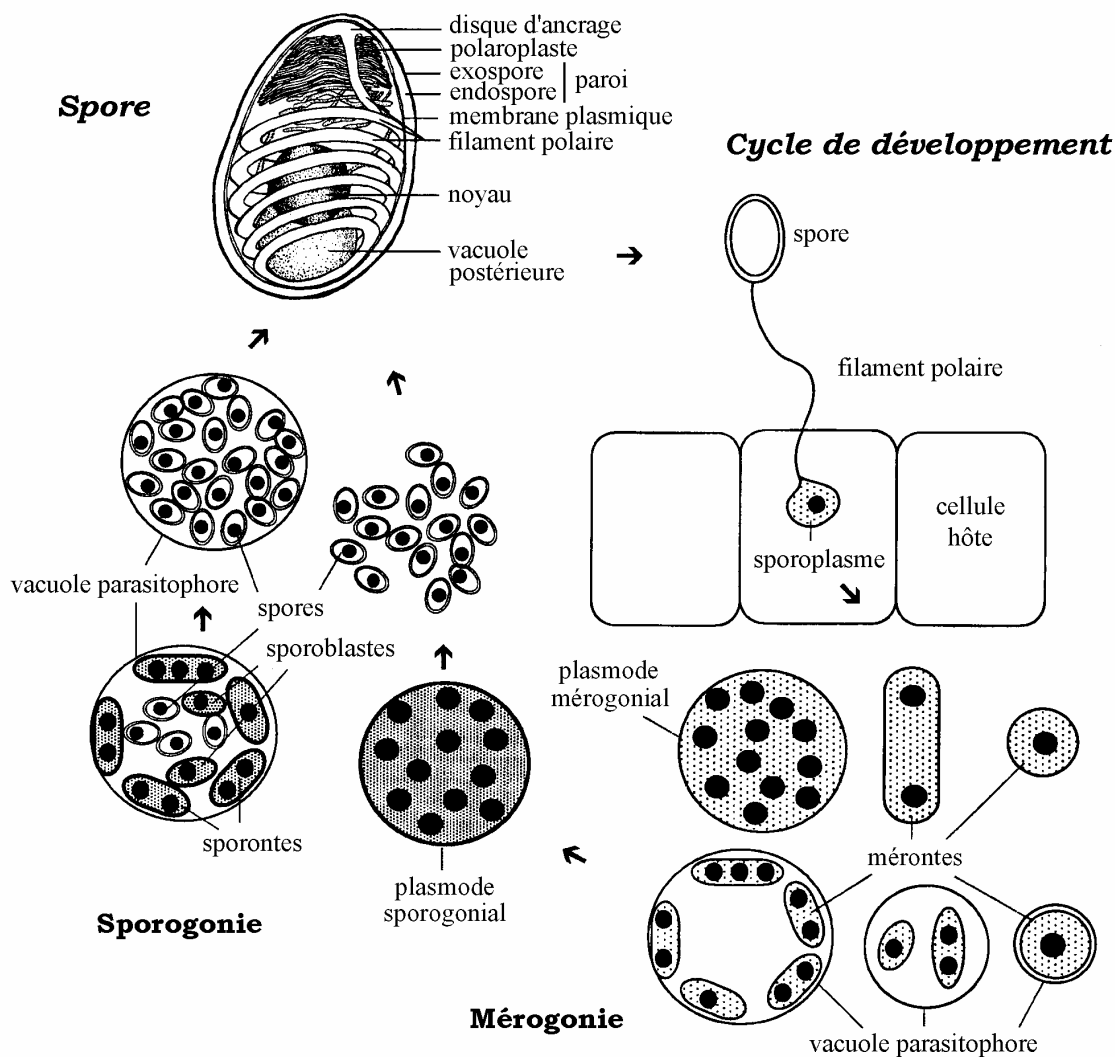
Le gonflement de la vacuole postérieure exerce une pression qui pousse le sporoplasme à l'intérieur du tube polaire.

Le mécanisme par lequel le tube polaire pénètre à l'intérieur de la cellule hôte reste mal connu. Pendant très longtemps, il a été admis que la décharge du tube polaire provoquait la rupture mécanique de la membrane plasmique de la cellule hôte, permettant l'injection du sporoplasme directement dans le cytoplasme de celle-ci (Weidner et al., 1984). Néanmoins, des travaux récents suggèrent que la pénétration du tube polaire dans la cellule hôte met en jeu un processus phagocytaire particulier, apparemment induit par le parasite (Magaud et al., 1997). La membrane plasmique de la cellule hôte semble s'invaginer autour du tube polaire au contact de celui-ci ; la formation de cette invagination est associée à un réarrangement de l'actine de la cellule hôte (Foucault et Drancourt, 2000).

### **A-3.3 La mérogonie**

La phase proliférative ou mérogonie débute après l'inoculation du sporoplasme infectieux dans la cellule hôte (Figure 3). Les cellules en division, désignées par le terme de mérontes, sont entourées d'une membrane et possèdent un noyau simple ou présent sous la forme d'un diplocaryon ; leur cytoplasme est riche en ribosomes libres ou associés au réticulum endoplasmique (Cali et Takvorian, 1999). Les noyaux des mérontes subissent plusieurs divisions successives. Dans certains cas, la division du noyau est immédiatement suivie de celle du cytoplasme (*Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*). Dans d'autres cas, le cytoplasme ne se divise pas et les noyaux issus de plusieurs divisions demeurent groupés au sein d'un cytoplasme commun, aboutissant à la formation d'un plasmode mérogonial (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*). Selon les espèces, la mérogonie se déroule soit en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte (*Nosema*, *Enterocytozoon*),

soit à l'intérieur d'une vacuole parasitophore formée à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte (*Encephalitozoon*) ou d'une couche amorphe sécrétée par le parasite (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*). Dans le cas du genre *Vittaforma*, le reticulum endoplasmique de la cellule hôte se réorganise pour entourer les mérontes en division.



**FIGURE 3 : Cycle de développement des microsporidies.** L'ultrastructure des stades méronte et sporonte varie selon les différents genres de microsporidies. (d'après Franzen et Müller, 1999)

### **A-3.4 La sporogonie**

La sporogonie constitue la séquence d'événements succédant à la mérogonie et aboutissant à la formation des spores, formes de résistance qui assurent la dissémination du parasite (Figure 3). Elle débute par la transformation des mérontes en sporontes, caractérisée par le dépôt localisé d'un matériel opaque aux électrons à la surface de la membrane plasmique mais aussi par l'augmentation progressive du nombre de ribosomes dans le cytoplasme, le développement du réticulum endoplasmique et l'apparition de l'appareil de Golgi (Cali et Takvorian, 1999). Les sporontes se divisent pour donner naissance à des sporoblastes qui se différencient ensuite en spores. Chez certains genres (*Nosema*, *Encephalitozoon*, *Vittaforma*), la division du noyau du sporonte est liée à celle du cytoplasme et chaque sporonte donne naissance uniquement à deux sporoblastes. A l'inverse, lorsque la division du noyau ne s'accompagne pas de celle du cytoplasme, la multiplication des sporontes aboutit à la formation d'un plasmode sporogonial (*Enterocytozoon*, *Pleistophora*). La maturation des sporoblastes en spores se traduit par la poursuite de l'épaississement de la membrane pour former une couche continue qui donnera naissance à l'exospore de la paroi. Le cytoplasme se devient plus dense suite à la différenciation du réticulum endoplasmique lisse et rugueux et au développement de l'appareil de Golgi. L'appareil d'extrusion de la spore se met également en place lors de la maturation du sporoblaste. Le mode de formation des différents organites qui le composent reste encore assez flou ; il semble que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi soient impliqués dans la formation du filament polaire, tandis que le polaroplaste et la vacuole postérieure auraient pour origine ces deux systèmes membranaires et/ou la membrane nucléaire (Bigliardi et Sacchi, 2001). La condensation du matériel nucléaire, la formation de l'endospore et la polarisation des organites du sporoblaste constituent les étapes ultimes de la maturation en spore. Selon les espèces, les spores mûres demeurent regroupées à l'intérieur d'une vacuole pansporoblastique délimitée par une

membrane élaborée par le sporonte (sous-ordre des Pansporoblastina), ou bien sont libres à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte (sous-ordre des Apansporoblastina).

## **A-4 Les microsporidioses humaines**

Parmi les quelques 150 genres de microsporidies connus aujourd'hui, seuls 7 genres (Tableau 3) ainsi que quelques espèces non classifiées (désignées par le terme générique *Microsporidium*) ont été décrits comme pathogènes chez l'homme (Franzen et Muller, 2001). La grande majorité des infections humaines est due aux deux genres, *Enterocytozoon* et *Encephalitozoon*, tandis que les autres genres (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Nosema*, *Vittaforma*, *Brachiola*) n'ont été observés que chez quelques patients.

### **A-4.1 Les genres *Pleistophora* et *Trachipleistophora***

Les microsporidies appartenant au genre *Pleistophora* sont des parasites communément rencontrés chez les insectes et surtout chez les poissons. Ils présentent la particularité de sécréter au cours de la mérogonie une couche protéique, qui isole les mérontes du cytoplasme de la cellule hôte et délimite la vacuole sporophore dans laquelle s'effectue la sporogonie (Desportes-Livage, 2000). Seuls trois cas d'infections ont été rapportés chez l'homme : deux cas chez des patients infectés par le VIH et un cas chez un patient non infecté par le VIH (Ledford et al., 1985; Chupp et al., 1993). Ces microsporidies sont responsables de myosites, qui résultent de l'infection des muscles squelettiques.

Un quatrième cas de myosite, associée à une sinusite et une kératoconjonctivite, a été diagnostiqué chez un patient australien au stade SIDA. La microsporidie responsable diffère des microsporidies du genre *Pleistophora*, du fait de certaines particularités ultrastructurales, notamment l'absence de formation de plasmode sporogonial au cours de la sporogonie. Ces

observations ont donc conduit à la création d'un nouveau genre pour ce parasite, dénommé *Trachipleistophora hominis* (Field et al., 1996; Hollister et al., 1996). Récemment, deux cas sévères de microsporidioses disséminées avec des parasites similaires ont été décrits chez deux individus atteints de SIDA (Yachnis et al., 1996; Orenstein et al., 1997). Bien que présentant les caractéristiques ultrastructurales du genre *Trachipleistophora*, cette microsporidie se distingue de *T. hominis* par la formation de deux types différents de vacuoles sporophores et de spores au cours de la sporogonie ; elle a donc été classée comme une nouvelle espèce *Trachipleistophora antropophthera* (Vavra et al., 1998). Il s'agit de l'unique espèce dimorphique de microsporidie décrite chez l'homme.

#### **A-4.2 Le genre *Nosema***

La plupart des espèces de microsporidies appartenant au genre *Nosema* parasitent les animaux invertébrés et plus particulièrement les insectes. Leur développement s'effectue au contact direct du cytoplasme de la cellule hôte et tous les stades parasitaires ont un noyau présent sous la forme d'un diplocaryon (Vávra et Larsson, 1999; Desportes-Livage, 2000). Chez l'homme, plusieurs espèces initialement apparentées au genre *Nosema* et totalement inconnues ont été identifiées, avant d'être reclassées dans d'autres genres (*Vittaforma* ou *Brachiola*). En 1991, un cas d'infection oculaire chez un patient immunocompétent de 39 ans, présentant des ulcérations de la cornée, a été attribué à une nouvelle espèce du genre *Nosema* (Cali et al., 1991). Les similitudes morphologiques entre cette microsporidie *Nosema ocularum* et l'espèce *Nosema algerae*, récemment mise en évidence chez l'homme et reclassée dans le genre *Brachiola*, ont conduit à émettre l'hypothèse non confirmée selon laquelle ces deux parasites seraient en fait identiques (Tramer et al., 1997).

TABLEAU 3 : Principales caractéristiques des microsporidies infectant l'homme.

Genre / Espèce	Taille de la spore (µm)	Nombre de spires (filament polaire)	Noyau <sup>a</sup>	Localisation principale de l'infection
<b>Enterocytozoon</b>				
<i>E. bienewisi</i>	1,1-1,6 x 0,6-0,9	5-7	uni	intestin grêle
<b>Encephalitozoon</b>				
<i>E. cuniculi</i> <sup>b</sup>	2,5-3,2 x 1,2-1,6	4-5 ou 5-7	uni	cerveau, foie, cœur, systèmes respiratoire et urinaire, reins
<i>E. hellem</i> <sup>b</sup>	2,0-2,5 x 1,0-1,5	6-8	uni	cornée, conjonctive, systèmes respiratoire et urinaire
<i>E. intestinalis</i> <sup>b</sup>	1,5-2,0 x 1,0-1,2	4-7	uni	intestin grêle, tractus biliaire, reins, système respiratoire
<b>Pleistophora</b>				
<i>Pleistophora</i> sp.	3,2-3,4 x 2,8	9-12	uni	muscles squelettiques
<b>Trachipleistophora</b>				
<i>T. hominis</i>	4,0 x 2,4	11	uni	muscles squelettiques
<i>T. anthropophthera</i> <sup>c</sup>	3,7 x 2,0 2,2-2,5 x 1,8-2,0	9	uni	muscles squelettiques, cerveau, cœur, foie, reins
<b>Nosema</b>				
<i>N. ocularum</i>	5,0 x 3,0	9-12	diplo	stroma de la cornée
<b>Vittaforma</b>				
<i>V. cornea</i>	3,7-3,8 x 1,0-1,2	5-7	diplo	stroma de la cornée
<b>Brachiola</b>				
<i>B. connori</i>	4,0 x 2,0	10-12	diplo	infection disséminée
<i>B. vesicularum</i>	2,5-2,9 x 1,9-2,0	7-10	diplo	muscles squelettiques
<i>B. algerae</i>	4,4 x 2,8	7-8	diplo	stroma de la cornée

<sup>a</sup> L'appareil nucléaire de la spore est constitué soit d'un noyau unique (uni), soit d'un diplocaryon (diplo), c'est-à-dire deux noyaux étroitement associés et fonctionnant comme une seule entité.

<sup>b</sup> Ces espèces sont souvent responsables d'infections disséminées.

<sup>c</sup> Cette espèce dimorphique produit deux types de spores.



### **A-4.3 Le genre *Vittaforma***

Un autre cas de microsporidiose oculaire a été rapporté en 1990 chez un patient immunocompétent, âgé de 45 ans et atteint d'une kératite depuis 18 mois. La microsporidie responsable fut observée dans le stroma profond de la cornée puis décrite dans un premier temps sous le nom de *Nosema corneum*, notamment du fait de la présence de diplocaryon tout au long du cycle parasitaire (Shaddock et al., 1990). Cependant, contrairement aux autres espèces du même genre, les différents stades intracellulaires de ce parasite ne sont pas en contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte, mais localisés à l'intérieur d'une citerne du reticulum endoplasmique rugueux. Cette observation associée aux caractéristiques ultrastructurales des différents stades de développement, a conduit à transférer cette microsporidie dans un nouveau genre en tant que *Vittaforma cornae* (Silveira et Canning, 1995). Par la suite, cette nouvelle classification a été confirmée par la phylogénie moléculaire réalisée à partir de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S (Baker et al., 1994). Récemment, un cas d'infection disséminée avec *V. cornae* a été décrit en Suisse chez un patient atteint du SIDA (Deplazes et al., 1998).

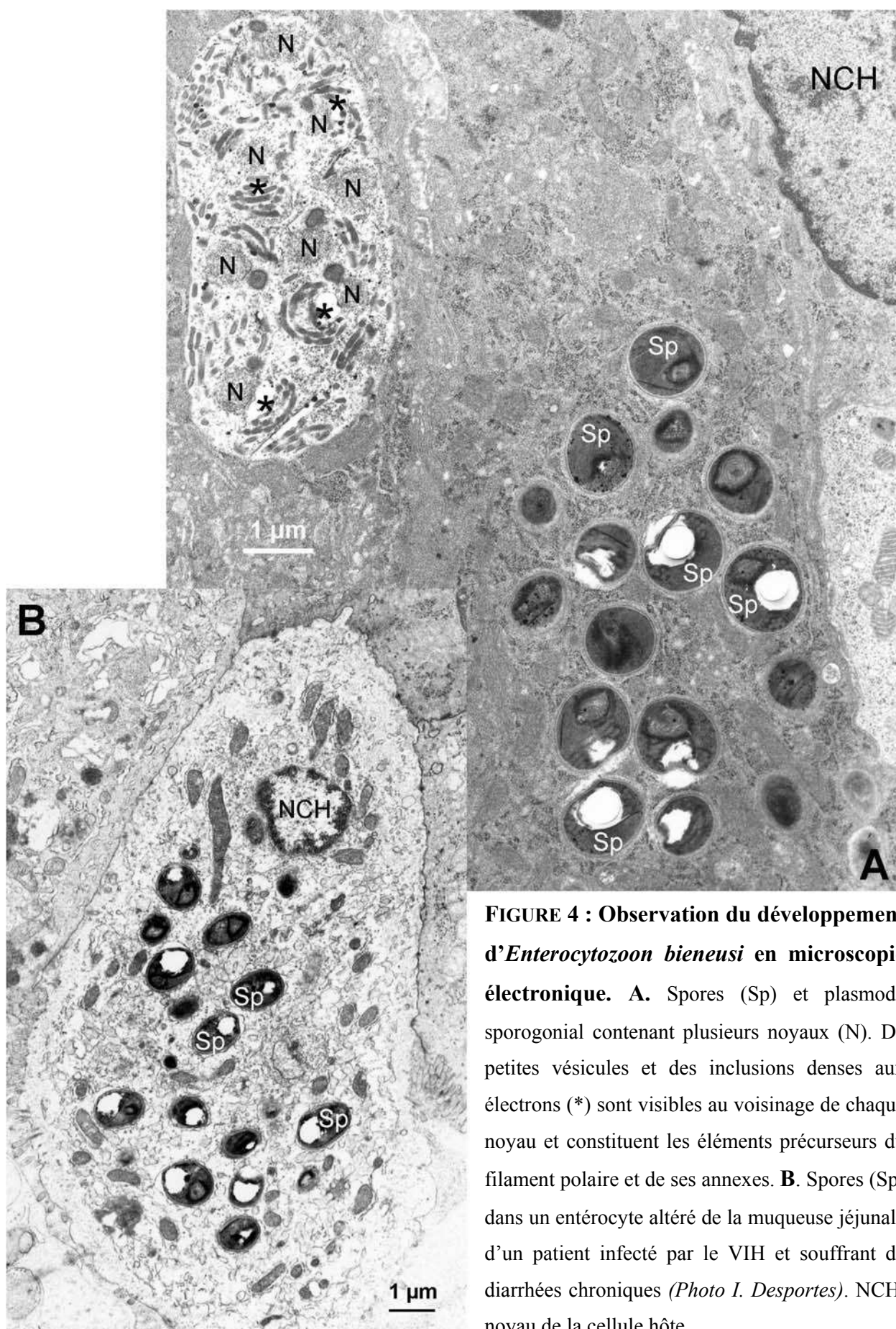
### **A-4.4 Le genre *Brachiola***

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

infection généralisée (Margileth et al., 1973; Sprague, 1974) ; et de *Brachiola algerae* (*Nosema algerae*), microsporidie parasite du moustique, responsable d'un cas de kératite récemment observé chez un patient immunocompétent (Visvesvara et al., 1999; Lowman et al., 2000).

#### **A-4.5 Le genre *Enterocytozoon***

*Enterocytozoon bieneusi* est la seule espèce assignée au genre *Enterocytozoon*. Son développement s'effectue au contact direct du cytoplasme de la cellule hôte (Figure 4) et se singularise par la formation de plasmodes plurinucléés (Cali et Owen, 1990; Cali et Takvorian, 1999). Ces derniers présentent en microscopie électronique un aspect fissuré dû à la présence de formations membranaires rectilignes et brillantes aux électrons, qui persistent tout au long du cycle de développement intracellulaire. Les plasmodes mérogoniaux sont issus de la division des stades précoces uninucléés au cours de la mérogonie. La sporogonie est caractérisée par la différenciation du filament polaire et de ses annexes avant la formation des sporoblastes. Elle débute avec l'accumulation autour de chaque noyau d'inclusions denses aux électrons, structures précurseurs du filament polaire et du disque d'ancrage. Les plasmodes sporogoniaux se fragmentent ensuite en sporoblastes par invagination de la membrane qui les délimitent. Simultanément, un matériel dense aux électrons se dépose à la surface de celle-ci pour donner naissance à l'exospore. L'apparition tardive de ce matériel, sécrété dès le début de la sporogonie et avant la formation du filament polaire chez les autres microsporidies, est typique du développement d'*E. bieneusi*. La maturation des sporoblastes aboutit à la production de petites spores ovales (1,1 à 1,6  $\mu\text{m}$  sur 0,6 à 0,9  $\mu\text{m}$ ), dont le filament polaire forme autour du noyau unique une double spirale comprenant 5 à 7 tours de spires (Vávra et Larsson, 1999).



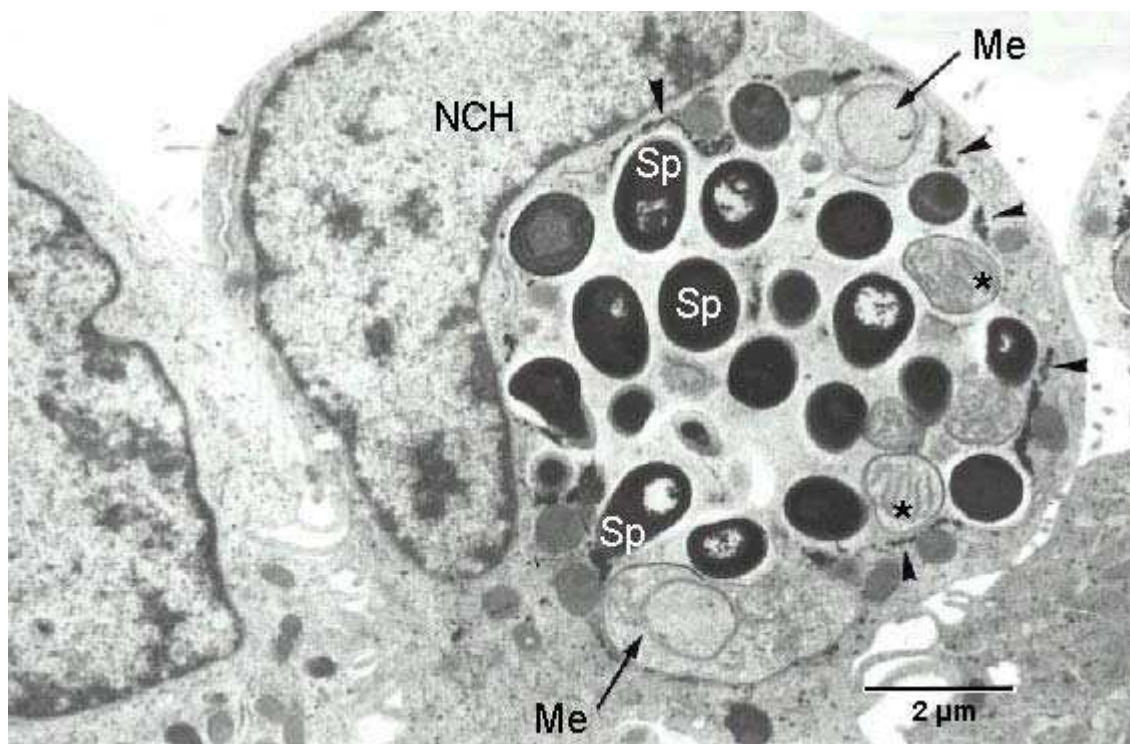
**FIGURE 4 : Observation du développement d'*Enterocytozoon bienersi* en microscopie électronique.** **A.** Spores (Sp) et plasmode sporogonial contenant plusieurs noyaux (N). De petites vésicules et des inclusions denses aux électrons (\*) sont visibles au voisinage de chaque noyau et constituent les éléments précurseurs du filament polaire et de ses annexes. **B.** Spores (Sp) dans un entérocyte altéré de la muqueuse jéjunale d'un patient infecté par le VIH et souffrant de diarrhées chroniques (Photo I. Desportes). NCH, noyau de la cellule hôte.

*E. bienewisi* fut détectée et décrite pour la première fois en 1985 chez un patient haïtien de 29 ans atteint du SIDA et présentant des diarrhées chroniques (Desportes et *al.*, 1985). Depuis, plusieurs centaines de cas d'infection par cette microsporidie ont été rapportés à travers le monde entier chez les patients au stade SIDA. *E. bienewisi* constitue aujourd'hui l'espèce la plus souvent rencontrée chez l'homme (Bryan et Schwartz, 1999). Elle infecte préférentiellement les entérocytes de l'épithélium de l'intestin grêle, à l'intérieur desquels tous les stades de développement sont localisés au pôle apical de la cellule (entre le noyau et les microvillosités). L'infection reste le plus souvent localisée au niveau de l'intestin grêle. Cependant, *E. bienewisi* a également été observée, dans certains cas, au niveau des cellules non parenchymateuses du foie, des cellules épithéliales du tractus biliaire et de la vésicule biliaire, et des cellules de l'épithélium de la trachée ainsi que des épithéliums bronchique et nasal (Franzen et Müller, 1999; Franzen et Muller, 2001).

#### **A-4.6 Le genre *Encephalitozoon***

Les microsporidies appartenant au genre *Encephalitozoon* parasitent les animaux vertébrés terrestres (Canning et Lom, 1986; Didier et *al.*, 1998). Leur développement s'effectue de façon asynchrone à l'intérieur d'une vacuole parasitophore délimitée par une membrane d'origine cellulaire (Cali et Takvorian, 1999) ; tous les stades de développement coexistent ainsi dans une même vacuole (Figure 5). Les mérontes se multiplient par division binaire et demeurent associés à la membrane de la vacuole parasitophore. Certains d'entre eux évoluent en sporontes, reconnaissables à la présence d'une couche superficielle de matériel dense aux électrons à l'origine de l'exospore de la paroi sporale. Les sporontes se détachent de la membrane de la vacuole parasitophore pour s'accumuler au centre de celle-ci. Ils donnent naissance par division binaire à des sporoblastes, dont la maturation (différenciation de l'appareil d'extrusion puis de l'endospore) aboutit à la production de spores. Ces spores sont

de taille différente selon l'espèce d'*Encephalitozoon* ; elles possèdent une endospore et une exospore épaisses, ainsi qu'un filament polaire formant autour du noyau unique plusieurs tours de spires disposés en une seule spirale (Vavra et Larsson, 1999).



**FIGURE 5 : Observation du développement d'*Encephalitozoon intestinalis* en microscopie électronique** (Photo I. Desportes). Le développement d'*E. intestinalis* s'effectue dans une vacuole parasitophore délimitée par une membrane (têtes de flèche). Tous les stades parasites coexistent à l'intérieur d'une même vacuole. NCH, noyau de la cellule hôte ; Me, méronite ; Sp, spore ; (\*), sporonte.

Trois espèces appartenant au genre *Encephalitozoon* sont pathogènes pour l'homme : *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* et *Encephalitozoon intestinalis*. *E. cuniculi* et *E. hellem* sont deux espèces morphologiquement identiques en microscopie optique et électronique ; seules leurs propriétés antigéniques, biochimiques et moléculaires (séquençage d'une région de l'ADN) permettent de les différencier. *E. hellem* fut isolée pour la première

fois en 1991 à partir de la cornée de trois patients au stade SIDA souffrant de kératoconjonctivite (Didier *et al.*, 1991). Depuis une cinquantaine de cas ont été rapportés chez les sujets infectés par le VIH. Ce parasite a pour cible l'épithélium superficiel de la cornée et la conjonctive, où sa multiplication est la cause de microsporidioses oculaires (Friedberg et Ritterband, 1999). Il peut également être à l'origine de pathologies respiratoires ou urinaires, voire d'infections disséminées lorsque l'immunodéficiences est sévère (Kotler et Orenstein, 1998; Kotler et Orenstein, 1999). Récemment, *E. hellem* a été identifiée chez des oiseaux de volières tels que les perroquets et les perruches (Black *et al.*, 1997; Pulparampil *et al.*, 1998). Cette observation suggère l'existence d'un réservoir aviaire pour cette microsporidie. Cette hypothèse est renforcée par le fait que certains patients atteints de kératoconjonctivite dues à *E. hellem* ont fréquemment été exposés à des oiseaux domestiques (Friedberg et Ritterband, 1999).

*E. cuniculi* constitue l'espèce microsporidienne la plus répandue chez les mammifères (Canning et Lom, 1986; Canning et Hollister, 1987; Snowden et Shaddock, 1999). Décrite dès 1922 chez le lapin, ce parasite a par la suite été détecté notamment chez les rongeurs (rat et souris), les animaux carnivores (chien, chat et renard) et les primates non humains (singes). Des analyses moléculaires ont permis d'identifier trois souches d'*E. cuniculi* parmi les nombreux isolats d'origine animale : la souche I (souche "lapin"), la souche II (souche "souris") et la souche III (souche "chien") (Didier *et al.*, 1995). Chacune de ces souches semble avoir une spécificité d'hôte et des caractéristiques épidémiologiques différentes (Mathis *et al.*, 1997). Chez l'homme, *E. cuniculi* est associée à des encéphalites, des hépatites et très souvent à des infections disséminées (Kotler et Orenstein, 1999; Franzen et Muller, 2001). Sur la base d'observations réalisées en microscopie optique et/ou électronique, plusieurs cas de microsporidioses chez des sujets infectés ou non par le VIH ont été attribués à *E. cuniculi* avant la découverte d'*E. hellem*. La mise en évidence de cette nouvelle espèce a remis en

cause la nature de l'agent étiologique responsable de ces infections et la capacité d'*E. cuniculi* à infecter l'homme. Cependant, la pathogénicité de cette microsporidie chez l'homme a par la suite été confirmée, grâce à l'utilisation de méthodes immunologiques et moléculaires. La présence d'*E. cuniculi* a ainsi été observée dans plusieurs cas sévères de microsporidioses disséminées, chez des patients infectés par le VIH présentant ou non un statut de SIDA déclaré (De Groote et al., 1995; Franzen et al., 1995; Weber et al., 1997). Par la suite, les souches I et III d'*E. cuniculi* ont été identifiées chez des patients immunodéprimés atteints de microsporidiose et vivant respectivement en Europe et aux Etats-Unis (Deplazes et al., 1996; Didier et al., 1996; Mathis et al., 1997; Snowden et al., 1999). Ces observations laissent supposer que les infections à *E. cuniculi* chez l'homme sont probablement des zoonoses.

*E. intestinalis* fut observée pour la première fois en 1992 dans les entérocytes et la *lamina propria*, au niveau de l'intestin grêle d'un patient au stade SIDA présentant des diarrhées chroniques (Orenstein et al., 1992). D'abord décrite sous le nom de *Septata intestinalis*, ce parasite fut ensuite reclassé en tant qu'*E. intestinalis*, sur la base des données issues de l'analyse phylogénétique des séquences codant pour l'ARNr 16S (Cali et al., 1993; Hartskeerl et al., 1995). Cette microsporidie se singularise des autres espèces du même genre, par l'aspect cloisonné de sa vacuole parasitophore ; celui-ci est dû à la sécrétion par les mérontes, lors de leur différenciation en sporontes, d'un matériel fibrillaire qui entoure les stades parasitaires (Cali et al., 1993; Vavra et Larsson, 1999). *E. intestinalis* a pour cible principale les entérocytes de l'intestin grêle, à l'intérieur desquels tous les stades parasitaires sont localisés au pôle apical de la cellule. Souvent responsable de microsporidioses disséminées, cette espèce infecte également les cellules endothéliales et les fibroblastes du chorion ainsi que les macrophages de la *lamina propria* qui assurent probablement sa dissémination à travers l'organisme. Dans plusieurs cas, *E. intestinalis* a aussi été détectée au

niveau des tubules rénaux, du tractus biliaire et des épithéliums nasal, bronchique et cornéen (Weber *et al.*, 1994; Kotler et Orenstein, 1998).

## **A-5 Les microsporidioses intestinales humaines**

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

### **A-5.1 Manifestations cliniques**

La diarrhée chronique est l'une des manifestations principales de la microsporidiose intestinale (Kotler et Orenstein, 1998; Franzen et Müller, 1999). Les selles sont au nombre de 3 à 10 par jour, molles, aqueuses et non sanglantes. Il s'y associe une malabsorption notamment des sucres (D-xylose, lactose) et des lipides, une perte de l'appétit consécutive à la perturbation des sécrétions gastriques et pancréatiques, des douleurs abdominales et une chute de poids progressive, aggravée dans les formes les plus sévères par une déshydratation entraînant la cachexie. Des déficits en potassium, magnésium, zinc et vitamine B12 sont également observés (Asmuth *et al.*, 1994). Tous ces désordres sont la conséquence de l'altération de l'épithélium de la muqueuse intestinale, dont le renouvellement ne compense plus la desquamation intense due à la multiplication du parasite dans les entérocytes. L'infection intestinale entraîne en effet une importante atrophie villositaire, caractérisée par une réduction de la hauteur et de la surface d'absorption des villosités. Sur un plan fonctionnel, elle se traduit par un déficit de l'activité lactase et une diminution des activités enzymatiques phosphatase alcaline et  $\alpha$ -galactosidase au niveau de la bordure en brosse de la muqueuse duodénale (Schmidt *et al.*, 1997).



A ce tableau clinique s'ajoutent des complications consécutives à la dissémination des parasites, surtout dans le cas d'*E. intestinalis*. Si les deux espèces peuvent être la cause de cholangite et de cholécystite, *E. intestinalis* est également à l'origine de sinusites, rhinites et néphrites (Franzen et Müller, 1999; Kotler et Orenstein, 1999). Une nécrose de la mâchoire et une kératoconjonctivite ont également été rapportées. L'infection de l'épithélium nasal par *E. bienewisi* pourrait expliquer la présence de spores de cette espèce dans le liquide bronchoalvéolaire (Weber et al., 1992b; Del Aguila et al., 1997).

### **A-5.2 Epidémiologie et transmission**

Plusieurs centaines de cas de microsporidioses intestinales humaines ont été rapportés à travers le monde entier (Bryan et Schwartz, 1999). *E. bienewisi* est l'espèce la plus souvent rencontrée avec une prévalence, chez les sujets infectés par le VIH, variant entre 2 et 50% selon les enquêtes épidémiologiques, tandis qu'*E. intestinalis* semble moins fréquemment mis en cause. Les taux de prévalence les plus élevés sont observés chez les patients symptomatiques présentant des diarrhées chroniques et une immunodépression sévère (nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> inférieurs à 100/mm<sup>3</sup>). Dans les pays industrialisés, les études les plus récentes font apparaître une diminution importante des cas de microsporidioses intestinales depuis l'introduction des multi-thérapies anti-rétrovirales (Conteas et al., 1998b). Cependant, la prévalence de ces infections reste non négligeable dans les pays en voie de développement où l'expansion de la pandémie de SIDA se poursuit.

Bien que les microsporidioses intestinales soient surtout des infections opportunistes endémiques chez les sujets atteints du SIDA, elles affectent également les individus non infectés par le VIH (Desportes-Livage et al., 1998). Les données de prévalence au sein de cette population sont peu nombreuses. Quelques cas d'infections par *Enterocytozoon bienewisi* ont ainsi été observés chez des sujets immunocompromis mais séronégatifs pour le VIH,

essentiellement des transplantés d'organes sous traitement immunosuppresseurs (Rabodonirina et al., 1996; Guerard et al., 1999; Metge et al., 2000; Mohindra et al., 2002). *E. bienewisi* et *E. intestinalis* ont également été diagnostiquées chez des individus immunocompétents non infectés par le VIH, notamment chez des voyageurs atteints de diarrhées ayant séjourné en zone tropicale ou subtropicale (Sandfort et al., 1994; Bryan et al., 1997; Raynaud et al., 1998). Dans une enquête réalisée au Mexique, des spores d'*E. intestinalis* ont été observées dans presque 8% des échantillons de selles prélevés chez les habitants de deux communes rurales agricoles des environs de Mexico (Enriquez et al., 1998a). L'existence d'infections dues à *E. intestinalis* chez les personnes immunocompétentes a été confirmée par des études sérologiques réalisées chez des donneurs de sang néerlandais et chez des femmes enceintes françaises. Les résultats obtenus indiquent des taux de prévalence relativement importants (respectivement 8 et 5%) au sein de ces deux populations pour les anticorps anti-*E. intestinalis* (Van Gool et al., 1997). L'ensemble de ces observations suggère que les microsporidioses intestinales seraient des infections asymptomatiques assez fréquentes parmi les personnes immunocompétentes, sporadiques, transitoires voire même peut-être latentes.

L'origine et le mode de transmission des microsporidioses intestinales chez l'homme restent mal connus. La présence du parasite au niveau du tractus intestinal, site privilégié de l'infection, et l'atteinte des épithéliums bronchique et nasal dans le cas des microsporidioses disséminées, suggèrent plusieurs modes de contamination possibles : féco-oral, par ingestion ou inhalation des spores, ou bien encore par aérosols. La transmission par voie orale ou rectale a été démontrée expérimentalement chez différents animaux de laboratoire (Achbarou et al., 1996; Accoceberry et al., 1997a; Accoceberry et al., 1997b; Tzipori et al., 1997; Kondova et al., 1998).

Les microsporidioses intestinales s'accompagne d'une excrétion des spores du parasite dans le milieu extérieur via les selles, les urines et les sécrétions respiratoires. Les personnes

infectées peuvent donc constituer une source potentielle de contamination. L'hypothèse d'une transmission directe de personne à personne a été évoquée par diverses enquêtes épidémiologiques, associant le risque de microsporidiose intestinale avec l'homosexualité masculine et la cohabitation avec une personne séropositive pour le VIH (Hutin et al., 1998). De plus, l'observation d'infections asymptomatiques chez les individus immunocompétents suggèrent l'existence de porteurs sains pour ces parasitoses (Van Gool et al., 1997).

Plusieurs réservoirs animaux ont été identifiés pour les microsporidies humaines. Une étude récente a permis d'observer la présence d'*E. intestinalis* chez le porc, la vache, la chèvre, l'âne et le chien (Bornay-Llinares et al., 1998). Par ailleurs, des spores d'*E. bienewisi* ont été mises en évidence dans les matières fécales de différents animaux : le porc (Breitenmoser et al., 1999), le lapin, le chien, le chat (Del Aguila et al., 1999; Mathis et al., 1999; Lores et al., 2002), le veau (Rinder et al., 2000), le singe macaque infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (Mansfield et al., 1997) et très récemment le poulet (Reetz et al., 2002). L'existence de ces réservoirs animaux a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les microsporidioses intestinales humaines seraient des zoonoses. Cependant, aucune preuve définitive d'une transmission directe de l'animal à l'homme n'a jusqu'à présent été rapportée. De plus, parmi les génotypes d'*E. bienewisi* identifiés chez les animaux naturellement infectés, aucun ne s'est révélé identique à ceux décrits chez l'homme, à l'exception de celui observé chez les macaques (Rinder et al., 1997; Mathis, 2000). Des études ont par contre confirmé la possibilité d'infecter expérimentalement divers mammifères (porc, rat, lapin, macaque rhésus) avec des souches d'*E. bienewisi* d'origine humaine (Accoceberry et al., 1997a; Accoceberry et al., 1997b; Tzipori et al., 1997; Kondova et al., 1998). L'homme pourrait donc constituer une source de contamination pour les animaux domestiques.

La mise en évidence d'*E. intestinalis* et d'*E. bienewisi* dans les effluents tertiaires, les eaux de vidange, les eaux de surface et les nappes phréatiques aux Etats-Unis et en France, a

suggéré l'hypothèse d'une transmission des microsporidioses intestinales par l'intermédiaire de l'eau (Sparfel et *al.*, 1997; Dowd et *al.*, 1998). Plusieurs enquêtes épidémiologiques ont identifié différents types de contact avec l'eau (baignades dans une étendue d'eau, consommation d'eau du robinet non filtrée ou d'eau de puits, utilisation d'humidificateurs) comme des facteurs de risque de contamination par ces parasites (Enriquez et *al.*, 1998a; Hutin et *al.*, 1998). Au cours de ces différentes études, aucune variation saisonnière de la prévalence des microsporidioses intestinales chez les patients infectés par le VIH n'a pu être observée, suggérant la présence des microsporidies à un niveau constant dans l'environnement (Conteas et *al.*, 1998a; Bryan et Schwartz, 1999). Cependant, la saison des pluies a récemment été associée à une recrudescence des cas de microsporidioses intestinales lors d'une enquête épidémiologique réalisée en Afrique sur une cohorte d'enfants atteints de diarrhées (Tumwine et *al.*, 2002).

En résumé, l'environnement et les animaux pourraient être des sources de contamination pour l'homme, notamment en raison de la viabilité des spores dans le milieu extérieur. Leur rôle dans la transmission des microsporidioses intestinales chez l'homme reste cependant très incertain. Ainsi, il n'est toujours pas exclu que les deux microsporidies responsables des microsporidioses intestinales, *E. intestinalis* et *E. bienewisi*, soient des parasites naturels de l'homme qui ne provoquent de maladies que chez les individus immunocompromis.

### **A-5.3 Diagnostic**

Le diagnostic des microsporidioses intestinales humaines repose essentiellement sur l'identification des parasites dans les différents échantillons cliniques provenant des patients, à savoir les biopsies intestinales (duodénum, jéjunum), les selles et différents liquides organiques (liquides d'aspiration duodénale, sucs biliaires, urines, lavages bronchoalvéolaires, ponctions nasales) (Weber et *al.*, 1999; Franzen et Muller, 2001). Dans les biopsies de tissus, tous

les stades de développement sont en général visibles, tandis que seules les spores peuvent être observées dans les échantillons de selles ou de liquides biologiques. En pratique, la recherche des spores dans les selles des patients constitue l'approche diagnostique préférentielle du fait de son caractère non invasif.

Initialement basée sur l'observation en microscopie électronique des échantillons cliniques, le diagnostic de routine des microsporidioses intestinales humaines s'effectue aujourd'hui essentiellement en microscopie optique. Récemment, la mise au point d'outils immunologiques et moléculaires applicables au diagnostic a ouvert de nouvelles perspectives en permettant la détection simple et spécifique d'une espèce donnée de microsporidies dans les échantillons de selles de patients.

#### *A-5.3.1 La microscopie électronique*

La microscopie électronique à transmission a été la première technique utilisée pour diagnostiquer les microsporidioses humaines, en raison de la taille réduite des spores. La détection des microsporidies est basée sur l'examen cytologique ou histologique des prélèvements cliniques, et la visualisation du filament polaire, structure caractéristique de la spore microsporidienne, constitue le principal critère de diagnostic (Weber *et al.*, 1999; Franzen et Muller, 2001). Cette technique permet également de déterminer le genre et l'espèce de la microsporidie incriminée, grâce à l'observation de l'ultrastructure fine de la spore et des différents stades de développement, mais aussi du mode de division et de la nature des relations hôte-parasite (Cali et Takvorian, 1999; Vavra et Larsson, 1999). La microscopie électronique assure une détection spécifique des microsporidies, mais cette méthode manque parfois de sensibilité, notamment dans le cas des échantillons de matières fécales ou de liquides organiques. Lourde et longue à mettre en œuvre, elle requiert un examen assez long et fastidieux des échantillons et n'est donc plus utilisée aujourd'hui pour le diagnostic de

routine. Néanmoins, elle demeure encore la technique de référence dans de nombreux laboratoires pour confirmer l'espèce de la microsporidie détectée.

### *A-5.3.2 La microscopie optique*

Le diagnostic des microsporidioses intestinales humaines en microscopie optique a longtemps été handicapé par la faible taille des spores et leurs propriétés tinctoriales particulières et variables. En effet, les colorations classiques utilisées en cytologie (Gram, Giemsa) ou en histologie (hématoxyline-éosine, Gram) ne permettent pas de distinguer facilement les microsporidies des autres éléments présents dans les préparations, souvent en raison d'un manque de contraste. Cependant, la mise au point ces dernières années, de nouvelles techniques de coloration a permis d'améliorer grandement la détection des spores en microscopie optique (Franzen et Muller, 2001; Garcia, 2002). Ces nouvelles colorations sont basées sur l'utilisation d'agents chromotropes comme le chromotrope 2R ("trichrome de Weber"), ou de fluorochromes tels que l'Uvitex 2B ou le Calcofluor. La technique du trichrome développée par Weber et *al.* permet une détection spécifique des spores, mais la réalisation de cette coloration est longue et délicate (Weber et *al.*, 1992a). Les colorations à l'Uvitex 2B ou au Calcofluor sont plus simples et plus rapides, mais elles nécessitent un microscope à fluorescence équipé de filtres particuliers pour l'observation des échantillons (Van Gool et *al.*, 1993; Contreas et *al.*, 1996). De plus, l'inconvénient majeur de cette méthode est le manque de spécificité des fluorochromes, qui réagissent non seulement avec la chitine de la paroi des spores, mais aussi avec celle présente dans la paroi des bactéries et des champignons (levures) contenus dans les selles des patients. Quelque soit la technique de coloration utilisée, la microscopie optique ne permet pas de déterminer avec certitude le genre et l'espèce de la microsporidie observée lors du diagnostic.

### A-5.3.3 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux

Le développement de modèles de culture *in vitro* pour plusieurs microsporidies infectant l'Homme a permis la production d'antigènes parasitaires, puis d'anticorps dirigés contre ces parasites (Visvesvara, 2002). L'utilisation de ces anticorps comme sondes immunologiques dans des tests d'immunofluorescence indirecte facilite la détection des microsporidies dans les échantillons cliniques. Plusieurs anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre *E. intestinalis*, *E. cuniculi* ou *E. hellem* ont ainsi été obtenus chez la souris ou le lapin, puis utilisés dans les laboratoires de recherche pour le diagnostic des microsporidioses humaines. Les premiers tests d'immunofluorescence impliquant des anticorps polyclonaux ont montré que plusieurs espèces de microsporidies partagent des propriétés antigéniques communes (Nieder Korn et al., 1980). Des sérums polyclonaux préparés contre *E. cuniculi* ou *E. hellem* ont ainsi permis la détection des spores d'*E. intestinalis* ou d'*E. bienewasi* dans différents échantillons cliniques (Zierdt et al., 1993; Aldras et al., 1994). L'utilisation de ces anticorps polyclonaux comme outils de diagnostic est donc limitée par l'existence de ces réactions croisées, qui empêchent toute détection spécifique d'une espèce donnée de microsporidie. A côté des sérums polyclonaux, plusieurs laboratoires de recherche ont développé un certain nombre d'anticorps monoclonaux, dirigés contre des protéines de la paroi de la spore ou du tube polaire (Enriquez et al., 1997; Lujan et al., 1998; Achbarou et al., 1999; Prigneau et al., 2000). Certains de ces anticorps monoclonaux reconnaissent plusieurs microsporidies, tandis que d'autres sont spécifiques d'une seule espèce (Beckers et al., 1996). De tels anticorps permettent non seulement de détecter la présence des microsporidies dans les échantillons cliniques, mais surtout de déterminer l'espèce incriminée sans avoir recours à des analyses ultrastructurales en microscopie électronique. Récemment, deux anticorps monoclonaux spécifiques d'*E. bienewasi* ont été produits puis testés avec succès pour diagnostiquer cette microsporidie dans les selles de patients infectés (Accoceberry et al., 1999).

La production d'antigènes parasitaires a également permis de développer un grand nombre de tests sérologiques (ELISA, test d'immunofluorescence indirecte, Western blot) visant à rechercher la présence d'anticorps anti-microsporidie (en particulier *E. intestinalis* et *E. cuniculi*) dans le sérum des patients (Franzen et Müller, 1999). Cependant, l'intérêt de ces différents tests pour le diagnostic des microsporidioses humaines reste limité, puisqu'un résultat positif peut être la conséquence d'une infection chronique, d'une exposition passée au parasite, mais aussi de réactions croisées avec d'autres espèces de microsporidies voire même de réactions non spécifiques. De plus, les données sérologiques sont difficilement interprétables chez les patients atteints du SIDA du fait de l'immunodéficience progressive, qui interfère avec le développement de la réponse humorale spécifique.

#### *A-5.3.4 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)*

Le séquençage de différents gènes chez plusieurs microsporidies parasites de l'Homme a permis l'application de la PCR au diagnostic des microsporidioses humaines (Franzen et Müller, 1999; Weiss et Vossbrinck, 1999). Divers couples d'amorces ont ainsi été sélectionnés pour détecter et identifier les microsporidies dans les échantillons cliniques provenant des patients. Ces amorces ont pour cible essentiellement des séquences du gène codant pour l'ARNr de la petite sous-unité des ribosomes (ARNr 16S), et plus rarement des séquences localisées au niveau de la région intergénique non transcrite (séquence ITS) ou du gène de l'ARNr de la grande sous-unité ribosomale (ARNr 23S). Différents types d'amorces ont été décrits ; certaines sont spécifiques d'une seule espèce, tandis que d'autres détectent indifféremment toutes les microsporidies du genre *Encephalitozoon* ou bien sont universelles et amplifient l'ADN de la plupart des microsporidies (Weiss et Vossbrinck, 1998; Franzen et Müller, 1999; Weiss, 2000). Dans ce dernier cas, plusieurs démarches expérimentales peuvent alors être mises en œuvre pour identifier l'espèce des microsporidies détectées : le séquençage



du fragment d'ADN amplifié, l'analyse de l'amplicon par hybridation avec des sondes nucléiques spécifiques de différentes espèces (Southern blot) ou bien par digestion avec des enzymes de restriction (RFLP). La PCR est un outil simple et puissant de plus en plus utilisée en combinaison avec la microscopie optique. Grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques, cette approche diagnostique se substitue à la microscopie électronique, pour déterminer le genre et l'espèce de la microsporidie observée. *E. intestinalis* et *E. bienersi* peuvent ainsi être diagnostiquées spécifiquement dans les selles de patients atteints de microsporidies intestinales en utilisant la PCR (Coyle et al., 1996; Liguory et al., 1997; Ombrouck et al., 1997; Raynaud et al., 1998; Talal et al., 1998).

#### **A-5.4 Traitement**

Les options thérapeutiques pour le traitement des microsporidies chez les patients infectés par le VIH sont peu nombreuses. Diverses molécules potentiellement actives contre les microsporidies ont été testées au cours des dernières années, mais peu se sont montrées réellement efficaces chez l'homme. L'albendazole est ainsi couramment utilisée dans le traitement des microsporidies intestinales dues à *E. intestinalis* (Dore et al., 1995; Molina et al., 1995; Molina et al., 1998). *In vitro*, cette molécule connue pour inhiber la polymérisation de la tubuline, bloque la division du parasite (Lacey, 1985; Didier, 1997). Son administration aux patients atteints de microsporidies intestinales entraîne une très nette amélioration de leur état clinique, qui se traduit par la disparition des diarrhées et des lésions de la muqueuse intestinale ainsi que par l'éradication du parasite dans les biopsies intestinales et les selles. Cependant, de nombreuses rechutes sont observées après l'arrêt du traitement, suggérant que le parasite n'est pas complètement éradiqué et peut donc échapper à l'action de l'albendazole (Molina et al., 1995; Shah et al., 1996). Toutefois, le maintien du traitement de façon prolongée semble prévenir les risques de rechutes (Molina et al., 1998). L'albendazole présente une

efficacité controversée vis-à-vis de la microsporidie *E. bienewisi* (Franzen et Müller, 1999). Des essais cliniques ont par contre montré la sensibilité de ce parasite à la fumagilline ; les patients traités avec cet antibiotique éliminent en effet rapidement et de façon durable *E. bienewisi*, comme le montre l'observation des selles et des biopsies de tissu intestinal (Molina et al., 2000; Molina et al., 2002). Son utilisation est cependant limitée par ses effets secondaires toxiques mais réversibles, qui se manifestent entre autre par une chute plus ou moins sévère des plaquettes chez les sujets traités (Molina et al., 2002). Le TNP-470 constitue une des alternatives à la fumagilline ; lors de test *in vitro*, cet analogue synthétique s'est en effet révélé moins toxique et tout aussi efficace vis-à-vis de nombreuses espèces de microsporidies infectant l'homme (Didier, 1997; Coyle et al., 1998). Une autre molécule, le thalinomide a également donné des résultats encourageants lors d'essais préliminaires chez des individus infectés par *E. bienewisi* (Sharpstone et al., 1997). Ce composé est connu pour inhiber l'action du TNF- $\alpha$ , cytokine pro-inflammatoire dont le taux fécal est plus élevé chez les patients infectés par le VIH ayant une microsporidiose intestinale.

Dans les pays industrialisés, l'introduction des multi-thérapies anti-rétrovirales s'est traduite par une amélioration de l'état clinique des patients au stade SIDA, qui s'explique par la restauration plus ou moins complète de l'immunité cellulaire concomitante à la diminution de la charge virale. Il en a résulté une importante réduction de la prévalence d'un grand nombre d'infections opportunistes, notamment des microsporidioses, chez les sujets immunodéprimés infectés par le VIH (Conteas et al., 1998b). Une rémission de la pathologie intestinale a ainsi été rapportée chez plusieurs individus au stade SIDA atteints de microsporidioses intestinales et suivant un traitement anti-rétroviral ; elle s'accompagne de la disparition des signes cliniques, des lésions de l'intestin grêle et du parasite dans les selles et les biopsies intestinales (Goguel et al., 1997; Carr et al., 1998; Conteas et al., 1998b). Toutefois, la

survenue rapide de rechutes après l'arrêt de la multi-thérapie laisse supposer que l'infection microsporidienne n'est pas entièrement éradiquée lors de la restauration du système immunitaire (Carr et *al.*, 1998).

La recherche de nouvelles molécules plus efficaces pour le traitement des microsporidioses est indispensable, d'autant plus que des phénomènes d'échappement aux multi-thérapies commencent à apparaître dans les pays industrialisés et que la progression du SIDA se poursuit en Afrique et dans certains pays d'Asie. Elle devrait bénéficier de l'accroissement des connaissances relatives au métabolisme des microsporidies, en particulier grâce à l'exploitation des données issues du séquençage complet du génome d'*E. cuniculi* (Weidner et *al.*, 1999; Katinka et *al.*, 2001; Keeling et Fast, 2002; Vivarès et *al.*, 2002). De plus, dans le cas des espèces du genre *Encephalitozoon*, l'existence de modèles de culture *in vitro* et parfois de modèles animaux facilite l'étude de nouveaux composés potentiellement actifs (Visvesvara, 2002). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* chez la souris se sont ainsi intéressées à l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques (Amara et *al.*, 2001; Ouarzane-Amara et *al.*, 2001; Bacchi et *al.*, 2002).

## **B- L'immunité anti-microsporidienne**

Le système immunitaire joue un rôle crucial dans le contrôle des infections microsporidiennes. Ainsi, la pathogénicité des microsporidioses humaines s'exprime surtout chez les sujets immunodéprimés, tels que les patients greffés sous traitement immunosuppresseur anti-rejet ou les patients infectés par le VIH (Weber *et al.*, 1994; Kotler et Orenstein, 1998). Les formes les plus sévères affectent les individus au stade SIDA, en particulier lorsque le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est inférieur à 100/mm<sup>3</sup> de sang (Asmuth *et al.*, 1994; Hutin *et al.*, 1998). A l'inverse, la microsporidiose intestinale est spontanément résolutive chez le sujet immunocompétent. Les données expérimentales confirment le rôle exercé par le système immunitaire dans le contrôle des microsporidioses. En général peu symptomatiques chez les animaux immunocompétents, ces infections sont létales chez les animaux immunodéficients, comme les souris atteintes de déficit immunitaire combiné sévère (souris SCID) ou les souris athymiques (souris "*nude*") (Gannon, 1980; Schmidt et Shaddock, 1983; Koudela *et al.*, 1993; Silveira *et al.*, 1993; Didier *et al.*, 1994).

L'intérêt pour l'immunobiologie des microsporidies s'est considérablement accru ces dernières années, en raison de l'impact croissant des microsporidioses chez l'homme suite à l'émergence du SIDA. Néanmoins, les études concernant ce domaine sont relativement peu nombreuses et l'immunité anti-microsporidienne est encore assez peu caractérisée. Chez l'homme comme chez les animaux, l'infection microsporidienne induit à la fois le développement d'une réponse immunitaire à médiation humorale et d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Didier et Bessinger, 1999; Didier, 2000; Khan *et al.*, 2001).

## B-1 L'immunité à médiation humorale

Chez les animaux immunocompétents, l'infection expérimentale avec *E. cuniculi* induit la production d'anticorps sériques spécifiques, appartenant aux trois principales classes d'immunoglobulines, IgM, IgG et IgA (Wicher *et al.*, 1991; Didier et Bessinger, 1999; Didier, 2000). Les anticorps de type IgM sont les premiers à apparaître dans le sérum et disparaissent dans les premiers mois suivant l'infection. A l'inverse, les anticorps de type IgG apparaissent plus tardivement et persistent à des taux relativement élevés en général tout au long de la vie de l'hôte. La détection simultanée d'IgM et d'IgG signale donc le caractère récent de la microsporidiose, tandis que la détection permanente d'IgG spécifiques chez les animaux ne présentant aucun signe clinique de microsporidiose, reflète la persistance d'une infection chronique (Didier et Bessinger, 1999). Plusieurs études ont montré que la voie d'inoculation des spores influence la cinétique de développement de la réponse humorale anti-microsporidienne. Chez le lapin et la souris, les premiers anticorps spécifiques sont détectés dans le sérum 7 à 10 jours après l'infection avec *E. cuniculi*, dans le cas d'une inoculation des spores par la voie parentérale (injection intrapéritonéale, intracérébrale, subcutanée ou intraveineuse), et approximativement 21 jours après l'infection dans le cas d'une inoculation par la voie orale (Waller *et al.*, 1978; Gannon, 1980; Schmidt et Shaddock, 1983; Kunstyr *et al.*, 1986).

Chez l'homme, la cinétique de production des anticorps au cours des microsporidioses n'est pas connue. Néanmoins, les singes macaques rhésus (primates non humains) infectés par voie intraveineuse avec *E. cuniculi*, *E. hellem* ou *E. intestinalis* présentent une réponse anticorps semblable à celle observée chez les lapins et les souris inoculés par la voie parentérale avec *E. cuniculi* (Didier *et al.*, 1992; Didier *et al.*, 1994).

Chez les animaux immunodéprimés, le développement de la réponse humorale anti-microsporidienne dépend du statut immunitaire de l'hôte. Ainsi, les souris athymiques et les souris SCID ne génèrent aucune réponse anticorps suite à leur inoculation avec des spores d'*E. cuniculi* ou d'*E. intestinalis* (Gannon, 1980; Hermanek et al., 1993). De même, les singes infectés par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS), dont le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le sang périphérique est inférieur à 10%, ne produisent pas d'anticorps en réponse à l'infection avec *E. cuniculi*, *E. hellem* ou *E. intestinalis*. Par contre, des IgM et des IgG spécifiques sont détectés dans le sérum de ces mêmes singes VIS<sup>+</sup>, lorsque leur taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est supérieur à 10% au moment de l'inoculation des spores (Didier et al., 1992; Didier et al., 1994). De façon similaire, les patients infectés par le VIH et atteints de microsporidiose présentent une réponse humorale anti-microsporidienne variable, selon leur statut immunologique au moment de leur contamination par les microsporidies (Didier et al., 1993).

Le rôle de l'immunité humorale dans la protection vis-à-vis des infections microsporidiennes demeure assez flou. Le transfert adoptif de lymphocytes B provenant de souris sauvages infectées avec *E. cuniculi*, à des souris athymiques ou des souris SCID, n'empêche pas la mort de ces animaux suite à l'inoculation de spores d'*E. cuniculi* (Khan et al., 2001). De même, le transfert passif de sérum hyperimmun ne protège pas les souris athymiques d'une infection létale avec *E. cuniculi* (Schmidt et Shaddock, 1983). L'ensemble de ces résultats démontre donc clairement que les anticorps ne sont pas suffisants pour permettre le contrôle et l'éradication des infections microsporidiennes. Néanmoins, des données sérologiques et parasitologiques indiquent que la présence d'anticorps maternels durant les quinze premiers jours suivant la naissance empêcherait le développement de lésions histologiques chez les lapins nouveaux-nés contaminés avec *E. cuniculi* (Bywater et Kellet,

1979). De plus, plusieurs études *in vitro* suggèrent un rôle des anticorps dans la limitation de la dissémination de l'infection. Comme toutes les microsporidies du genre *Encephalitozoon*, *E. cuniculi* peut infecter les macrophages et se multiplier à l'intérieur de ces cellules phagocytaires, grâce à l'absence de fusion entre la vacuole parasitophore et les lysosomes. Cependant, le traitement d'*E. cuniculi* avec des sérums hyperimmuns, en présence ou non de complément, réduit de façon significative la capacité de ce parasite à se multiplier dans des cultures de macrophages (Nieder Korn et Shadduck, 1980; Schmidt et Shadduck, 1984). Les anticorps peuvent en effet induire la destruction des microsporidies en favorisant la phagocytose (opsonisation) des spores par les macrophages ou bien en induisant l'activation du complément susceptible d'entraîner la lyse des stades parasitaires. Par ailleurs, des anticorps monoclonaux dirigés contre l'exospore ou le filament polaire sont capables d'inhiber l'infection de cellules non phagocytaires par les microsporidies du genre *Encephalitozoon* (Enriquez et al., 1998b; Khan et al., 2001). En résumé, il semble donc que les anticorps contribuent à la protection naturelle vis-à-vis des infections microsporidiennes, même si leur rôle est probablement mineur.

## **B-2 L'immunité à médiation cellulaire**

Le caractère opportuniste des microsporidioses intestinales humaines a été l'un des premiers indices suggérant l'importance de la réponse immune à médiation cellulaire dans le contrôle des infections microsporidiennes. Plusieurs études ont montré une certaine corrélation entre la diminution du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans le sang des patients infectés par le VIH, et l'augmentation de l'intensité des signes cliniques associés à la microsporidiose intestinale (Asmuth et al., 1994; Hutin et al., 1998; Kotler et Orenstein, 1998). A l'inverse, la restauration plus ou moins complète de l'immunité cellulaire (augmentation du taux de T CD4<sup>+</sup>) observée chez les individus au stade SIDA traités avec les multi-thérapies

anti-rétrovirales, s'accompagne d'une amélioration voire même d'une rémission de la pathologie intestinale associée aux microsporidioses (Goguel *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 1998; Contreas *et al.*, 1998b).

### **B-2.1 Rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>**

Les premières études expérimentales réalisées chez la souris ont également suggéré l'importance de la réponse immune cellulaire, et plus particulièrement des lymphocytes T, dans la résistance aux infections microsporidiennes. Les splénocytes isolés à partir des souris infectées avec *E. cuniculi* prolifèrent et sécrètent des cytokines après stimulation par les antigènes parasitaires (Schmidt et Shadduck, 1984; Didier et Shadduck, 1988; Liu *et al.*, 1989). Chez les souris immunocompétentes chroniquement infectées avec *E. cuniculi*, l'injection de corticoïdes provoque une réactivation de la microsporidiose, qui se traduit notamment par le développement d'ascites (Bismanis, 1970; Innes, 1970). Par ailleurs, les souris athymiques et les souris SCID, dépourvues de lymphocytes T fonctionnels, meurent après l'inoculation de spores d'*E. cuniculi*, d'*E. hellem*, de *Vittaforma cornea* ou de *Trachipleistophora hominis* (Hermanek *et al.*, 1993; Koudela *et al.*, 1993; Silveira *et al.*, 1993; Didier *et al.*, 1994; Hollister *et al.*, 1996). Des expériences de transfert adoptif ont permis de confirmer et de démontrer le rôle fondamental des lymphocytes T dans l'immunité anti-microsporidienne. Le transfert de splénocytes enrichis en lymphocytes T provenant de souris sauvages infectées, protège ainsi les souris athymiques et les souris SCID d'une infection létale avec *E. cuniculi* (Schmidt et Shadduck, 1984; Hermanek *et al.*, 1993). Par contre, le transfert de lymphocytes T naïfs ne confère aucune protection aux souris athymiques et aux souris SCID, sauf dans le cas où celui-ci est effectué au moins 15 jours avant l'infection de ces animaux (Schmidt et Shadduck, 1983; Schmidt et Shadduck, 1984; Hermanek *et al.*, 1993).



Récemment, diverses approches expérimentales ont permis d'appréhender le rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la protection contre les microsporidies. L'analyse par cytométrie de flux de la dynamique des différentes sous-populations lymphocytaires suggère que les cellules T CD8<sup>+</sup> sont impliquées dans la résistance aux microsporidies. En effet, l'inoculation par la voie intrapéritonéale de spores d'*E. cuniculi* induit chez les souris sauvages, une activation précoce et une expansion préférentielle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Khan et al., 1999). Par ailleurs, contrairement aux souris dépourvues de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et aux souris sauvages, les souris déficientes en cellules T CD8<sup>+</sup> inoculées avec *E. cuniculi* sont incapables de contrôler la multiplication et la dissémination du parasite et succombent donc à l'infection (Khan et al., 1999). L'ensemble de ces observations montre clairement, d'une part, que l'acquisition d'une immunité anti-microsporidienne semble dépendre exclusivement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, et d'autre part, que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> semblent jouer un rôle mineur dans la résistance aux microsporidies. Ces deux hypothèses sont confirmées par les résultats obtenus lors d'expériences de reconstitution réalisées chez des souris SCID. Braunfuchsova et al. observent en effet que l'inoculation par la voie intrapéritonéale d'*E. cuniculi* à des souris SCID, préalablement reconstituées avec des splénocytes provenant de souris naïves, induit une expansion préférentielle des cellules T CD8<sup>+</sup> (Braunfuchsova et al., 2001). De plus, l'effet protecteur obtenu par le transfert adoptif des splénocytes est abrogé lorsque ces derniers sont déplétés en lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, tandis qu'à l'inverse la déplétion en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> n'a aucune conséquence sur la survie des souris SCID (Braunfuchsova et al., 2001). Néanmoins, il est intéressant de noter que suite à l'inoculation d'*E. cuniculi*, les souris SCID reconstituées avec des splénocytes déplétés en cellules T CD8<sup>+</sup> commencent à mourir plus tardivement que les animaux non reconstitués ou reconstitués avec des splénocytes déplétés des sous-populations

T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (Braunfuchsova et al., 2002). Un tel résultat indique que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> contribuent probablement au contrôle des infections microsporidiennes.

D'autres expériences révèlent un rôle différent des sous-populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> dans la résistance aux infections microsporidiennes, lorsque le parasite est inoculé par la voie orale. Les souris SCID reconstituées avec des splénocytes déplétés à la fois en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> succombent suite à l'inoculation *per os* de spores d'*E. cuniculi* ou d'*E. intestinalis* (Braunfuchsova et al., 2002; Salat et al., 2002). Par contre, ni la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>, ni celle des cellules T CD8<sup>+</sup> n'abolissent l'effet protecteur vis-à-vis de l'infection microsporidienne, du transfert adoptif des splénocytes chez les souris SCID. Tous ces résultats indiquent donc que les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> semblent jouer un rôle équivalent dans la résistance aux microsporidioses, dans le cas d'une inoculation des spores par la voie orale. Par conséquent, l'importance relative de chacune des deux sous-populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> dans le contrôle des microsporidioses semble dépendre de la voie d'inoculation du parasite.

### **B-2.2 Rôle des cytokines**

L'un des mécanismes par lesquels les lymphocytes T contribuent à l'immunité anti-microsporidienne, est la production de cytokines (Schmidt et Shaddock, 1984; Liu et al., 1989). Plusieurs études indiquent en effet que les cytokines de type Th1, et plus particulièrement l'IFN- $\gamma$ , jouent un rôle majeur dans la résistance aux microsporidioses (El Fakhry et al., 2001a; Khan et al., 2001). Ainsi, les cellules péritonéales isolées des souris BALB/c infectées avec *E. cuniculi* sécrètent, après stimulation par des antigènes parasitaires, davantage d'IFN- $\gamma$  par rapport aux cellules péritonéales issues des souris naïves ou des souris SCID infectées (Braunfuchsova et al., 1999). De plus, les souris C57BL/6 inoculées avec *E. cuniculi* développent une pathologie exacerbée lorsqu'elles sont traitées avec des anticorps

neutralisants dirigés contre l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-12, et succombent à l'infection, tout comme les souris génétiquement déficientes pour l'IFN- $\gamma$  ou pour l'IL-12 (p40<sup>-/-</sup>) (Khan et Moretto, 1999). Par ailleurs, contrairement aux souris sauvages, les souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  inoculées avec *E. intestinalis* sont incapables d'éliminer le parasite, comme en témoigne le caractère chronique et disséminée de la microsporidiose chez ces animaux (Achbarou et al., 1996; El Fakhry et al., 1998; El Fakhry et al., 2001b).

L'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes T peut exercer son action anti-parasitaire en stimulant l'activité microbicide des macrophages. Des expériences *in vitro* montrent en effet qu'après stimulation par l'IFN- $\gamma$  et/ou le LPS, des macrophages péritonéaux de souris sont capables d'inhiber la multiplication de la microsporidie *E. cuniculi* via la production de monoxyde d'azote NO (Didier et Shaddock, 1994; Didier et al., 1994; Didier, 1995). Cependant, les souris dépourvues d'activité NO synthase inductible (souris iNOS<sup>-/-</sup>) ne manifestent aucun signe clinique de microsporidioses suite à l'inoculation d'*E. cuniculi* et sont capables de survivre à l'infection (Khan et Moretto, 1999). Par contre, ces mêmes souris développent une infection létale lorsqu'elles sont traitées avec un anticorps neutralisant anti-IFN- $\gamma$ . Tous ces résultats suggèrent qu'en l'absence de NO, un ou plusieurs autres mécanismes dépendant de l'IFN- $\gamma$  sont impliqués dans le contrôle de l'infection. L'activité anti-parasitaire des macrophages activés peut également s'exprimer via la production de radicaux libres de l'oxygène. Récemment, l'équipe de Didier a observé que des souris dépourvues d'activité oxydative survivent à l'infection par *E. cuniculi* (Didier et al., 2001). Néanmoins, ces animaux présentent une charge parasitaire plus importante que les souris sauvages, suggérant un rôle des dérivés oxygénés dans la limitation de la dissémination de l'infection.

### **B-2.3 Rôle de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Les lymphocytes T peuvent également contribuer à la protection contre les infections microsporidiennes via leur capacité à lyser les cellules parasitées. Chez les souris immunocompétentes, l'inoculation d'*E. cuniculi* induit la mise en place d'une réponse cytotoxique ; les lymphocytes T isolés à partir de la rate des souris infectées sont en effet capables de lyser spécifiquement des macrophages péritonéaux infectés avec *E. cuniculi*, selon un mécanisme restreint par le CMH (Khan et al., 1999; Braunfuchsova et al., 2001). Des expériences de déplétion *in vitro* montrent que cette activité cytotoxique dépend de la sous-population de splénocytes T CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, les souris dépourvues de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou génétiquement déficientes pour la perforine succombent à l'infection par *E. cuniculi* (Khan et al., 1999). L'ensemble de ces résultats démontre clairement l'importance de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans le contrôle des microsporidioses.

Selon Moretto et al., l'induction de la réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique spécifique de l'antigène est indépendante des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, l'amplitude de la réponse T CD8<sup>+</sup> cytotoxique est en effet identique chez les souris CD4<sup>-/-</sup> et chez les souris sauvages d'*E. cuniculi*, de même que le profil de sécrétion des cytokines par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Moretto et al., 2000). La microsporidiose offre donc un exemple d'infection, au cours de laquelle une réponse immune cellulaire T CD8<sup>+</sup> peut se développer en l'absence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Un tel mécanisme a déjà été décrit pour certaines infections virales (Binder et Kundig, 1991).

### **B-2.4 Rôle des cellules "natural killer" et des lymphocytes T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>**

Comme mentionné précédemment, les souris SCID reconstituées avec des splénocytes déplétés en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> succombent à l'infection orale avec *E. cuniculi* ou *E. intestinalis*. Néanmoins, ces animaux survivent plus longtemps que les souris SCID non

reconstituées (Braunfuchsova *et al.*, 2002; Salat *et al.*, 2002). Ce résultat suggère donc que des cellules immunitaires autres que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> sont impliquées dans le contrôle des microsporidioses.

#### ***B-2.4.1 Les cellules "natural killer" (NK)***

Les cellules NK sont connues pour jouer un rôle important dans la résistance innée aux infections parasitaires (Scharton-Kersten et Sher, 1997). L'importance des cellules NK dans l'immunité cellulaire anti-microsporidienne a été étudiée chez les animaux immunocompétents et immunodéficients. Si plusieurs observations suggèrent que les cellules NK contribuent probablement au contrôle des microsporidioses, aucune étude n'a cependant pu mettre en évidence un rôle crucial de ces cellules dans l'immunité anti-microsporidienne. Ainsi, l'inoculation d'*E. cuniculi* induit une augmentation précoce de l'activité cytotoxique des cellules NK chez les souris BALB/c, tout comme chez les souris athymiques (Nieder Korn *et al.*, 1983). Par ailleurs, il est intéressant de noter que les splénocytes isolés des souris athymiques (déficientes en lymphocytes T) présentent une activité cytolitique NK plus importante que ceux provenant des souris BALB/c. Enfin, l'augmentation de l'activité NK chez les souris SCID infectées s'accompagne d'une production d'IFN- $\gamma$ , susceptible de stimuler l'activité microbicide des macrophages connue pour intervenir dans le contrôle de la multiplication du parasite (Salat *et al.*, 2001). Néanmoins, cette activation des cellules NK ne semble pas corrélée avec la réduction de la charge parasitaire chez ces animaux (Salat *et al.*, 2001). Par ailleurs, les souris déficientes en cellules NK (souris "*beige*") ne succombent pas à l'infection par *E. cuniculi*, tandis que l'infection microsporidienne est fatale chez les souris athymiques malgré la persistance d'une activité cytolitique NK plus élevée que chez les souris sauvages (Nieder Korn *et al.*, 1983). En résumé, le rôle des cellules NK dans la résistance aux infections microsporidiennes demeure donc encore assez flou.

#### B-2.4.2 Les lymphocytes T TCR $\gamma\delta^+$

Les lymphocytes T TCR $\gamma\delta^+$  sont considérés comme le maillon entre l'immunité naturelle dépendante des cellules NK et l'immunité spécifique dépendante des cellules T TCR $\alpha\beta^+$ . Plusieurs études suggèrent que ces cellules T TCR $\gamma\delta^+$  sont impliquées dans la mise en place de la réponse immune primaire (Ferrick et *al.*, 1995). Récemment, l'analyse phénotypique des splénocytes en cytométrie de flux a montré que le pourcentage de cellules T TCR $\gamma\delta^+$  augmente au cours de l'infection microsporidienne chez les souris immunocompétentes (Moretto et *al.*, 2001). D'autre part, les souris déficientes en lymphocytes T TCR $\gamma\delta^+$  (souris  $\delta^{-/-}$ ) meurent suite à l'inoculation d'un très grand nombre de spores d'*E. cuniculi* (Moretto et *al.*, 2001). Néanmoins, ces animaux  $\delta^{-/-}$  sont capables de résister à l'infection avec un faible nombre de spores, contrairement aux souris CD8 $^{-/-}$  ou TCR $\alpha\beta^{-/-}$  (Khan et *al.*, 2001; Moretto et *al.*, 2001). Cette susceptibilité accrue des souris  $\delta^{-/-}$  semble s'expliquer par une réduction importante de la réponse cytotoxique T CD8 $^+$  spécifique de l'antigène. De plus, le transfert adoptif de cellules T TCR $\alpha\beta^+$  CD8 $^+$  provenant de souris  $\delta^{-/-}$  ne permet pas de protéger des souris déficientes en lymphocytes T CD8 $^+$  d'une infection létale avec *E. cuniculi* (Moretto et *al.*, 2001). Sur la base de ces résultats, il apparaît donc que les lymphocytes T TCR $\gamma\delta^+$  jouent un rôle majeur dans l'induction et la régulation de la réponse T CD8 $^+$  au cours des microsporidioses ; ces cellules pourraient exercer cette fonction via leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$ , cytokine connue pour être impliquée dans l'induction et le maintien d'une immunité cellulaire T CD8 $^+$ .

## C. Chimiokines et réponse immunitaire

### C-1 Définition et classification des chimiokines

Le terme de "chimiokines" a été proposé en 1992 pour désigner une famille de cytokines, qui possèdent toutes en commun un pouvoir attracteur sur les leucocytes (notamment les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes) et présentent 20 à 95% d'homologie de séquence. Actuellement, une cinquantaine de chimiokines différentes ont été identifiées. Ces molécules sont des protéines de faible poids moléculaire, formées d'une unique chaîne polypeptidique de 70 à 100 acides aminés. Elles sont caractérisées par la présence, dans la région N-terminale de leur séquence primaire, d'au moins 4 résidus cystéines en position conservée qui, en permettant la formation de ponts disulfure, leur confèrent une structure tertiaire caractéristique. La famille des chimiokines est subdivisée en 4 sous-familles en fonction d'une part, du nombre d'acides aminés cystéine, et d'autre part, de la position relative des deux premiers résidus cystéine (Tableau 4) (Murphy et Baggiolini, 2000; Zlotnik et Yoshie, 2000). Cette distinction structurale est généralement corrélée avec des propriétés biologiques différentes (Rollins, 1997).

► La sous-famille des chimiokines "C-X-C" ou  $\alpha$ -chimiokines, regroupe les chimiokines qui possèdent 4 résidus cystéine et dont les deux premiers sont séparés par un acide aminé. Deux groupes de chimiokines peuvent être distingués au sein de cette sous-famille en fonction de la présence ou non d'un motif acide glutamique/leucine/arginine (ELR) entre l'extrémité N-terminale et le premier résidu cystéine. Les  $\alpha$ -chimiokines porteuses du motif ELR exercent un pouvoir attracteur sur les neutrophiles, tandis que celles qui en sont dépourvues attirent préférentiellement les lymphocytes.

**TABLEAU 4: Quelques exemples de chimiokines des familles "C-X-C" et "C-C" et leurs cellules cibles.**

CHIMIOKINES	CELLULES CIBLES
<i>Chimiokines C-X-C</i>	
ELR	
CXCL1 (GRO- $\alpha$ )	neutrophiles
CXCL2 (GRO- $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ )	neutrophiles
CXCL3 (GRO- $\gamma$ , MIP-2 $\beta$ )	neutrophiles
CXCL-8 (IL-8)	neutrophiles, basophiles, lymphocytes T, cellules NK
NON ELR	
CXCL9 (MIG)	monocytes, lymphocytes T activés, cellules NK
CXCL10 (IP-10)	lymphocytes T activés, cellules NK
CXCL11 (i-TAC)	lymphocytes T activés
CXCL-12 (SDF-1 $\alpha$ )	lymphocytes T, lymphocytes B, cellules dendritiques, monocytes, thymocytes
<i>Chimiokines C-C</i>	
CCL1 (TCA-3, I309)	monocytes, lymphocytes T, thymocytes
CCL2 (MCP-1)	monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, basophiles
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, basophiles, éosinophiles, cellules dendritiques, thymocytes
CCL4 (MIP-1 $\beta$ )	monocytes, lymphocytes T, cellules dendritiques, thymocytes
CCL5 (RANTES)	monocytes, lymphocytes T, éosinophiles, basophiles, cellules NK, cellules dendritiques, lymphocytes B, thymocytes
CCL7 (MCP-3)	monocytes, lymphocytes T, éosinophiles, basophiles, cellules dendritiques, cellules NK, thymocytes
CCL8 (MCP-2)	monocytes, lymphocytes T, éosinophiles, basophiles, cellules NK
CCL9 (MIP-1 $\gamma$ )*	lymphocytes T
CCL11 (eotaxin)	éosinophiles, basophiles, lymphocytes T
CCL12 (MCP-5)*	monocytes, lymphocytes T, basophiles
CCL13 (MCP-4)	monocytes, lymphocytes T, éosinophiles, basophiles, cellules NK

Pour chaque chimiokine, le nom commun est précisé entre parenthèses à côté du nom défini selon la nomenclature officielle. \* Chimiokines identifiées uniquement chez la souris.



➤ la sous-famille des chimiokines "C-C" ou  $\beta$ -chimiokines, rassemble les chimiokines qui possèdent également 4 résidus cystéine, mais dont les deux premiers sont adjacents. Ces molécules sont chimiotactiques pour les monocytes, les éosinophiles, les basophiles, les cellules dendritiques, les cellules NK et les lymphocytes. Par contre, elles n'ont aucun effet attracteur sur les neutrophiles.

➤ la sous-famille des chimiokines "C" ou  $\gamma$ -chimiokines, est constituée des cytokines ne possédant que deux des quatre cystéines conservées. Cette famille ne comprend actuellement qu'un seul membre, la lymphotactine, chimiotactique pour les cellules T et NK.

➤ la sous-famille des chimiokines "C-X<sub>3</sub>-C" ou  $\delta$ -chimiokines, regroupe les chimiokines avec 4 résidus cystéine conservés, dont les deux premiers sont séparés par trois acides aminés. Cette sous-famille ne comporte qu'un seul membre, la fractalkine exerçant son pouvoir attracteur sur les lymphocytes T et les cellules NK.

Une autre classification des chimiokines repose sur les caractéristiques physiologiques de ces molécules ; elle prend en compte plus particulièrement les conditions et la localisation de leur production ainsi que la distribution cellulaire de leurs récepteurs (Baggiolini, 1998; Moser et Loetscher, 2001). Il existe ainsi des chimiokines homéostatiques ou constitutives, et des chimiokines inflammatoires ou inductibles (Tableau 5). Les chimiokines homéostatiques sont produites de façon constitutive au niveau des organes lymphoïdes et/ou non lymphoïdes (peau, muqueuses) ; elles jouent un rôle important dans la migration physiologique des leucocytes, notamment au cours la différenciation, de la maturation et de l'activation par l'antigène des leucocytes dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les chimiokines inflammatoires sont induites en réponse à des cytokines pro-inflammatoires ou à des agents pathogènes et sont sécrétées par les cellules inflammatoires infiltrées et/ou les cellules résidentes, au niveau des tissus inflammés et/ou infectés. Ces chimiokines amplifient

la réponse inflammatoire et participent à la mise en place de la réponse immunitaire effectrice, via le recrutement sélectif des granulocytes, des monocytes et des lymphocytes T.

**TABLEAU 5: Chimiokines inflammatoires et chimiokines homéostatiques.**

CHIMIOKINES	RECEPTEURS	CELLULES CIBLES
<i>Chimiokines inflammatoires</i>		
i-TAC, MIG, IP-10	CXCR3	lymphocytes T effecteurs
RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2, MCP-3	CCR1	lymphocytes T effecteurs
MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4	CCR2	lymphocytes T effecteurs
Eotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4	CCR3	lymphocytes T effecteurs (Th2)
RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2	CCR5	lymphocytes T effecteurs (Th1)
I309	CCR8	lymphocytes T effecteurs (Th2)
Fractalkine	CX3CR1	lymphocytes T effecteurs
MDC, TARC*	CCR4	lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2), lymphocytes T mémoires, thymocytes
LARC*	CCR6	lymphocytes T effecteurs, cellules B, lymphocytes T mémoires
<i>Chimiokines homéostatiques</i>		
CTACK, MEC	CCR10	cellules T mémoires (CLA)
SDF-1	CXCR4	lymphocytes T naïves et mémoires, lymphocytes B, thymocytes
BCA-1	CXCR5	lymphocytes T auxiliaires folliculaires, lymphocytes B
SLC, ELC	CCR7	lymphocytes T naïves et mémoires, lymphocytes B, thymocytes médullaires matures
TECK	CCR9	lymphocytes T mémoires, lymphocytes B, thymocytes immatures

\* Certains chimiokines appartiennent à la fois à la famille des chimiokines inflammatoires et à celle des chimiokines homéostatiques.  
(d'après Moser et Loetscher, 2001)

Les chimiokines produisent leurs effets biologiques par l'intermédiaire de récepteurs présents à la surface des cellules cibles. Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Murdoch et Finn, 2000; Horuk, 2001). Ils sont nommés en fonction de la sous-famille de chimiokines qu'ils reconnaissent. Il existe ainsi à l'heure actuelle 10 récepteurs aux chimiokines de la sous-famille "C-C" (CCR1 à CCR10), 6 récepteurs aux chimiokines "C-X-C" (CXCR1 à CXCR6), un récepteur (XCR1) pour la lymphotactine et enfin un récepteur (CX<sub>3</sub>CR1) pour la fractalkine. Les interactions chimiokine/récepteur sont caractérisées par une importante promiscuité. En effet, la plupart des récepteurs interagissent avec plusieurs chimiokines et la majorité des chimiokines interagit avec plus d'un récepteur. Néanmoins, il faut noter que chaque récepteur est en général spécifique d'une des sous-famille de chimiokines.

## **C-2 Rôles des chimiokines dans la réponse immunitaire**

Les chimiokines jouent un rôle crucial dans la mise en place des réponses immunitaires et inflammatoires. De nombreux types cellulaires sont capables de sécréter de façon abondante ces molécules, suite à l'interaction avec divers parasites (contact, pénétration, infection) ou à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires. Des expériences *in vitro* utilisant différents lignées cellulaires, ont en effet démontré que l'infection par *T. gondii* induit la sécrétion de chimiokines "C-C" et "C-X-C" par ces cellules (Brenier-Pinchart *et al.*, 2001). L'une des fonctions les plus évidentes et importantes des chimiokines est le recrutement des cellules immunitaires effectrices (macrophages, granulocytes et lymphocytes T) au site de l'infection. Plusieurs études montrent par exemple que les chimiokines contribuent à la mise en place de l'inflammation observée au niveau intestinal, suite à l'infection avec *Cryptosporidium parvum* (Laurent *et al.*, 1997; Seydel *et al.*, 1998; Lacroix-Lamande *et al.*, 2002).

Les lymphocytes T activés ou effecteurs sont subdivisés en deux familles, selon la nature des cytokines qu'ils produisent. Les lymphocytes Th1 sécrètent surtout de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , cytokines impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire qui permet l'élimination des pathogènes intracellulaires. Par contre, les lymphocytes Th2 produisent essentiellement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10, cytokines associées au développement d'une immunité à médiation humorale caractérisée par la production d'anticorps. Les chimiokines sont capables d'influencer la nature de la réponse immunitaire mise en place suite à une infection, en permettant le recrutement sélectif et préférentiel, soit des lymphocytes effecteurs Th1, soit des lymphocytes effecteurs Th2. Cette propriété résulte de la différence d'expression des récepteurs pour les chimiokines à la surface de ces deux sous-populations lymphocytaires. En effet, les lymphocytes Th1 expriment plutôt les récepteurs CCR5 et CXCR3 (Loetscher *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 1998), tandis que les lymphocytes Th2 expriment CCR2 et CCR4 (Sallusto *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 1999). De ce fait, les chimiokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES sont chimiotactiques uniquement pour les cellules Th1 (Siveke et Hamann, 1998).

Outre leur rôle dans le recrutement approprié des cellules T effectrices, diverses observations ont également montré que les chimiokines peuvent, par elles-mêmes, induire ou influencer la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 ou Th2 (Wong et Fish, 2003). Le profil d'expression des chimiokines détermine en effet la polarisation de la réponse immune. Aliberti *et al.* rapportent ainsi que l'infection avec *T. gondii* induit la production de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES; la fixation de ces chimiokines sur le récepteur CCR5 fournit le signal nécessaire pour induire la production d'IL-12 par les cellules dendritiques CD8<sup>+</sup>, permettant ainsi le développement d'une réponse immune de type Th1 et donc l'élimination du parasite (Aliberti *et al.*, 2000).

En conclusion, l'effet des chimiokines sur la polarisation de la réponse immune vers un profil Th1 ou Th2, est d'une importance capitale pour le contrôle des infections parasitaires, ce dernier étant associé à une réponse immune de type Th1.

## D- L'immunité de la muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale est constituée d'un épithélium soutenu par un tissu conjonctif appelé chorion ou *lamina propria*. Elle forme non seulement une importante surface d'échange avec le milieu extérieur au niveau de laquelle s'effectue l'absorption des nutriments, mais également une barrière physiologique et immunologique contre un grand nombre de substances étrangères et de micro-organismes.

Plusieurs facteurs non immunologiques assurent la défense de la muqueuse intestinale vis-à-vis des pathogènes. La flore bactérienne saprophyte résidente et les sécrétions digestives créent ainsi un environnement défavorable à la croissance de nombreux agents pathogènes, tandis que certaines substances (comme la lactoferrine, la lactoperoxydase et le lysozyme) peuvent inhiber leur multiplication. Le péristaltisme intestinal associé au mucus et au glycocalyx permet de réduire les interactions éventuelles entre les pathogènes et les cellules épithéliales. Enfin, le caractère cohésif de l'épithélium dû aux jonctions étroites entre les cellules épithéliales empêche le passage intercellulaire des agents pathogènes.

La protection de la muqueuse intestinale est également assurée par le tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal ou GALT, en particulier lorsque les mécanismes de défense non spécifique ont échoué. Le GALT ("*gut-associated lymphoid tissue*") contient à lui seul plus de cellules immunitaires que le reste de l'organisme et peut être morphologiquement et fonctionnellement divisé en deux parties : d'une part les plaques de Peyer, sites inducteurs de la réponse immunitaire intestinale, et d'autre part les lymphocytes répartis au sein de l'épithélium intestinal (lymphocytes intraépithéliaux ou LIEs) et de la *lamina propria*, sites effecteurs de la réponse immune.

La voie orale constitue la voie naturelle d'entrée des microsporidies humaines *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* dans l'organisme. Les entérocytes de l'épithélium intestinal sont ainsi le premier et principal site de multiplication de ces parasites (Kotler et Orenstein, 1998; Franzen et Müller, 1999). Par conséquent, nous nous intéresserons ici plus particulièrement au rôle des entérocytes et des lymphocytes intra-épithéliaux dans l'immunité de la muqueuse intestinale.

## **D-1 Les entérocytes**

Les entérocytes représentent le principal type cellulaire de l'épithélium intestinal. Ces cellules ne jouent pas uniquement un rôle de barrière physique passive, mais contribuent également activement à l'élaboration et/ou au maintien de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale.

### **D-1.1 Les entérocytes, sources de chimiokines et de cytokines**

Les entérocytes sont des cellules susceptibles de sécréter des chimiokines et des cytokines (Stadnyk, 2002). Plusieurs études *in vitro* ont en effet montré que l'infection des entérocytes par divers micro-organismes invasifs ou non invasifs, notamment par certains parasites, induit la sécrétion d'une grande variété de chimiokines. Ainsi, l'infection d'entérocytes humains ou murins par *Toxoplasma gondii* induit la production de diverses chimiokines, principalement MCP-1, IP-10 et MIP-2 (Buzoni-Gatel et al., 2001; Mennechet et al., 2002). De même, l'infection avec *Cryptosporidium parvum* stimule la sécrétion des chimiokines MCP-1, RANTES, IP-10, KC et MIP-2 par les entérocytes murins de la lignée ICcl2 (Lacroix-Lamande et al., 2002), et celle de l'IL-8 et de GRO- $\alpha$  par les entérocytes humains des lignées Caco-2 et HCT-8 (Laurent et al., 1997).

Par ailleurs, la production de chimiokines par les entérocytes peut également être induite et modulée par les cytokines provenant des entérocytes eux-mêmes, des lymphocytes intraépithéliaux (LIEs) ou des cellules de la *lamina propria*. L'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  sont ainsi de puissants inducteurs de la sécrétion de chimiokines par les entérocytes (Warhurst et al., 1998; Lacroix-Lamande et al., 2002; Mennechet et al., 2002). De plus, ces cellules sont susceptibles de répondre à toutes les cytokines utilisant la chaîne récepteur  $\gamma_c$  (l'IL-2, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-13 et l'IL-15) et plusieurs études suggèrent que le TGF- $\beta$ , l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-15 régulent négativement la production de certaines chimiokines par les entérocytes (Lugering et al., 1998; Lugering et al., 1999a; Lugering et al., 1999b; Buzoni-Gatel et al., 2001).

Outre les chimiokines, les entérocytes sont également une source de cytokines pro- et anti-inflammatoires, telles que l'IL-1( $\alpha/\beta$ ), l'IL-6, l'IL-7, l'IL-15, l'IL-18, le GM-CSF, mais aussi l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Stadnyk, 2002). Ces deux dernières cytokines participent probablement au maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale (De Winter et al., 2002). En revanche, certaines cytokines ne sont jamais sécrétées par les entérocytes notamment l'IFN- $\gamma$ , l'IL-12 et l'IL-4.

L'activation des entérocytes par les cytokines ou par les micro-organismes pathogènes (suite à l'adhésion ou à l'infection) s'accompagne également de l'expression et de la synthèse de diverses enzymes impliquées dans la production des eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes) et du monoxyde d'azote NO. Ce dernier peut selon les conditions contribuer au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal ou bien contribuer à son altération en amplifiant le processus inflammatoire (Alican et Kubes, 1996; Elliott et Wallace, 1998). Le NO module en effet certaines propriétés physiologiques des entérocytes, notamment l'apoptose, l'endocytose et la perméabilité (Wallace et Miller, 2000). Il favorise également la production de



certaines chimiokines et cytokines par les entérocytes et participe à la résistance de ces cellules vis-à-vis des pathogènes intracellulaires et plus particulièrement des parasites (James, 1995; Clark et Rockett, 1996; Wallace et Miller, 2000).

### **D-1.2 Les entérocytes, cellules présentatrices de l'antigène**

Les entérocytes expriment de façon constitutive les molécules du CMH de classe I et II et sont donc capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T (Bland, 1998; Hershberg et Mayer, 2000; Shao et *al.*, 2001). En raison de leur polarisation, les entérocytes captent probablement les antigènes principalement au niveau du pôle apical, tandis que la présentation s'effectue uniquement à la surface de la membrane basolatérale (Hershberg et Mayer, 2000).

L'absence des molécules de co-stimulation B7-1 et B7-2 a dans un premier temps suggéré que les entérocytes sont des cellules présentatrices de l'antigène peu efficaces (en comparaison avec les macrophages et les cellules dendritiques), induisant l'anergie et la tolérance plutôt que l'activation des cellules T (Sanderson et *al.*, 1993; Kasper et Buzoni-Gatel, 2001). Il existe néanmoins plusieurs études décrivant les entérocytes comme des cellules présentatrices de l'antigène efficaces pour la sélection et l'activation des lymphocytes de la *lamina propria* ou de l'épithélium intestinal. Selon des données récentes, les entérocytes peuvent également induire l'activation d'une sous-population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suppresseurs, après présentation de l'antigène selon un mécanisme non conventionnel, participant ainsi à la régulation de la réponse immunitaire intestinale (Campbell et *al.*, 1999).

### **D-1.3 Rôle des entérocytes dans la réponse humorale intestinale**

Les entérocytes jouent également un rôle primordial dans la réponse immunitaire humorale au niveau intestinal. Ces cellules assurent en effet le transport vers la lumière

intestinale des IgA dimériques, sécrétées par les plasmocytes de la *lamina propria* (Kraehenbuhl et Neutra, 1992; Macpherson et *al.*, 2001). Ce phénomène est un processus actif appelé transcytose. Les IgA dimériques se fixent sur le récepteur des immunoglobulines polymériques (récepteur poly-Ig) présent à la surface basolatérale des entérocytes, puis les complexes récepteur/IgA sont internalisés par endocytose et transportés à travers le cytoplasme entérocytaire vers le pôle apical. Le clivage par protéolyse limitée du récepteur poly-Ig permet ensuite le relargage des IgA dimériques sous forme d'IgA sécrétoires. La région N-terminale du récepteur poly-Ig demeure en effet associée aux IgA dimériques pour former le composant sécrétoire, qui masque les sites potentiels de clivage protéolytique des IgA et les protège ainsi de l'action des enzymes intestinales. Les IgA sécrétoires représentent l'isotype prédominant parmi les anticorps détectés dans les sécrétions de la muqueuse intestinale. Plusieurs études ont montré que ces anticorps participent à l'immunité intestinale en prévenant l'attachement des pathogènes à la surface de l'épithélium (Kraehenbuhl et Neutra, 1992; Macpherson et *al.*, 2001).

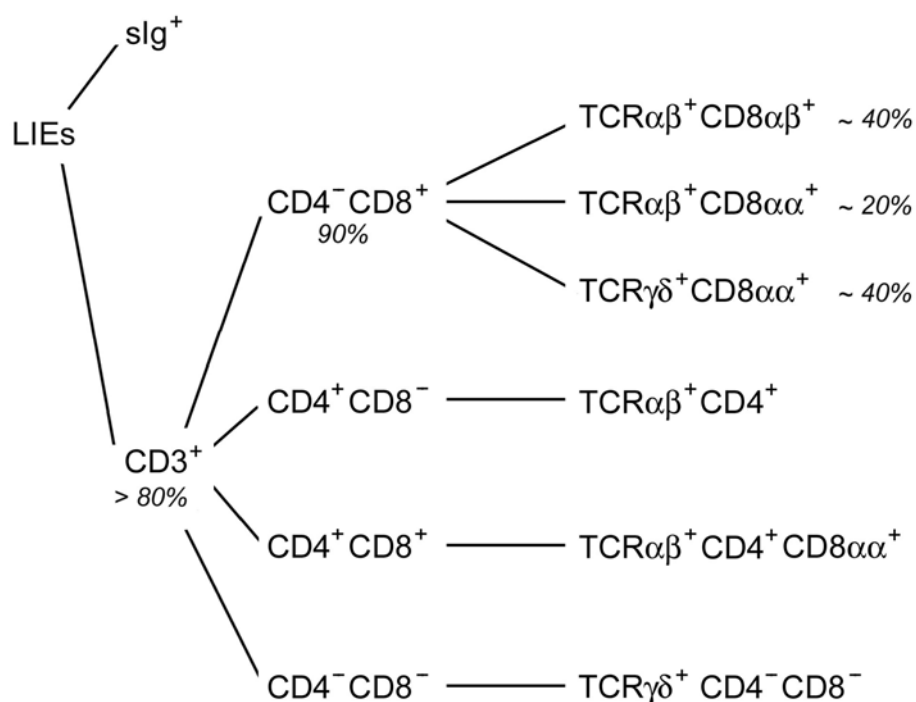
## **D-2 Les lymphocytes intraépithéliaux (LIEs)**

Les lymphocytes intraépithéliaux (LIEs) constituent l'une des plus importantes populations lymphocytaires associées au tractus gastro-intestinal. Ces cellules sont localisées au-dessus de la lame basale de l'épithélium intestinal, entre les cellules épithéliales à une fréquence d'environ 1 LIE tous les 5 à 6 entérocytes (Fergusson, 1977). De par leur localisation, les LIEs constituent la première ligne de défense immunitaire de l'organisme vis-à-vis des pathogènes entériques.

## D-2.1 Phénotype

Chez la souris, les LIEs de l'intestin sont majoritairement des lymphocytes T (Guy-Grand et Vassalli, 1993; Beagley et Husband, 1998). Plusieurs études basées sur les techniques de cytométrie de flux et d'immunohistochimie *in situ* ont en effet montré que plus de 80% de ces cellules sont CD3<sup>+</sup>, tandis que très peu présentent des immunoglobulines de surface (Ig<sup>+</sup>). Par ailleurs, la majorité (jusqu'à 90%) des LIEs intestinaux exprime le marqueur CD8 (Figure 6). Parmi les LIEs CD8<sup>+</sup>, deux sous-populations cellulaires peuvent être distinguées selon la nature homo- ou hétérodimérique de la molécule CD8 (Guy-Grand et *al.*, 1991; Lefrançois, 1991). La première sous-population dite thymo-dépendante exprime la molécule CD8 $\alpha\beta$  conventionnelle, porte le récepteur TCR $\alpha\beta$  et est identique à celle que l'on trouve dans les organes lymphoïdes. La seconde sous-population en revanche est atypique; thymo-indépendante, elle représente environ 60% des LIEs CD8<sup>+</sup> et se caractérise par l'expression d'une molécule CD8 homodimérique de type CD8 $\alpha\alpha$ . Ces cellules CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> expriment majoritairement à leur surface le récepteur TCR $\gamma\delta$ . Ainsi, la sous-population cellulaire CD8<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> est considérablement enrichie dans l'épithélium intestinal en comparaison avec les autres compartiments lymphoïdes de l'organisme (Goodman et Lefrançois, 1988). En plus des cellules CD8<sup>+</sup>, les LIEs de l'intestin peuvent être divisés en trois sous-populations supplémentaires qui représentent au maximum 5 à 15% des LIEs CD3<sup>+</sup>: les cellules CD4<sup>+</sup>, les cellules "double positive" CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et les cellules "double négative" CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Beagley et Husband, 1998). Les LIEs CD4<sup>+</sup> expriment tous le récepteur TCR $\alpha\beta$ , de même que la majorité des LIEs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Quant aux cellules CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, elles sont majoritairement TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> et peuvent représenter jusqu'à 10% des LIEs totaux chez la souris, alors que ce type de lymphocytes est très rare dans la circulation systémique.

Chez l'homme, les LIEs sont également majoritairement des lymphocytes T dont 75% sont  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  et 15%  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  (Jarry *et al.*, 1990). La proportion de cellules  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  peut cependant varier selon l'âge de l'individu et la région de l'intestin considérée.



**FIGURE 6 : Caractéristiques phénotypiques des lymphocytes intraépithéliaux (LIEs) de l'intestin chez la souris**

En 2001, Hayday *et al.* ont proposé de simplifier la classification simplifiée des LIEs, en répartissant ces cellules en deux populations cellulaires, dites de type "a" et de type "b" (Hayday *et al.*, 2001). Le type "a" est constitué par les LIEs  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}\alpha\beta^+$ , qui reconnaissent l'antigène dans un contexte conventionnel, c'est-à-dire après présentation par les molécules du CMH de classe I ou II et sont activés dans le compartiment systémique. Le type "b" comprend les LIEs  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}\alpha\alpha^+$  et  $\text{TCR}\gamma\delta^+$   $\text{CD8}\alpha\alpha^+$  qui répondent à l'antigène

de façon non restreinte par les molécules du CMH conventionnelles. L'analyse par la technique de "microarrays" de l'expression de différents gènes a révélé que les différentes sous-populations de LIEs de type "b" ( $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\alpha^+$ ,  $\text{TCR}\gamma\delta^+ \text{CD8}\alpha\alpha^+$ ,  $\text{TCR}\gamma\delta^+ \text{CD4}^- \text{CD8}^-$ ) ont des profils d'expression très similaires (Hayday et al., 2001).

La majorité des LIEs sont des cellules activées positives pour l'isoforme CD45RO, caractéristique des cellules mémoires. L'ensemble des LIEs de l'intestin exprime également à leur surface l'intégrine  $\alpha_E\beta_7$  (CD103) qui constitue le récepteur de l'E-cadhérine, molécule présente à la surface des cellules épithéliales (Roberts et Kilshaw, 1993; Kilshaw et Karecla, 1997). Plusieurs études ont montré que cette intégrine  $\alpha_E\beta_7$  semble impliquée dans la migration et/ou le maintien des LIEs dans l'épithélium intestinal (Kim et al., 1997; Schon et al., 1999).

## D-2.2 Développement et origine des LIEs

Plusieurs études ont démontré le rôle essentiel des cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 dans le développement des LIEs intestinaux (Fujihashi et al., 1997; Inagaki-Ohara et al., 1997; Porter et Malek, 1999). Ainsi, les souris génétiquement déficientes pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 ( $\text{IL-7R}\alpha$ ) sont dépourvues de LIEs  $\text{CD8}\alpha\alpha^+ \text{TCR}\gamma\delta^+$ , tandis que le développement de toutes les sous-populations de LIEs est altéré chez les souris déficientes pour la chaîne  $\gamma_c$  du récepteur à l'IL-7, utilisée également par plusieurs autres cytokines (IL-2, IL-4, IL-9 et IL-15). De plus, le nombre de LIEs  $\text{CD8}\alpha\alpha^+$  est fortement réduit chez les souris  $\text{IL-2}^{-/-}$  ou  $\text{IL-2R}\beta^{-/-}$ , tout comme chez les animaux doublement déficients pour l'IL-2 et l'IL-7R $\alpha$ . Ces observations suggèrent l'importance de l'IL-2 dans le développement de la sous-population des LIEs  $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ . Enfin, les souris  $\text{IL-2R}\beta^{-/-} \text{IL-7R}\alpha^{-/-}$  sont quasiment dépourvues de LIEs, quelque soit la sous-population considérée (Porter et Malek, 1999).

Diverses analyses phénotypiques ont permis de démontrer que les différentes sous-populations de LIEs CD8<sup>+</sup> ont des origines différentes. Ainsi, les souris athymiques sont dépourvues de LIEs CD8αβ<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> (LIEs de type "a") mais aussi de LIEs CD4<sup>+</sup> TCRαβ<sup>+</sup> (Lefrançois et Puddington, 1995). La sélection et la maturation de ces deux sous-populations dépendent donc du thymus. La première activation antigénique des précurseurs post-thymiques des LIEs thymo-dépendants a probablement lieu dans les plaques de Peyer sous l'influence des antigènes luminaux, présentés par les cellules M ou par les cellules dendritiques (Hayday et *al.*, 2001; Guy-Grand et Vassalli, 2002). Néanmoins, il semblerait que cette stimulation antigénique puisse aussi avoir lieu en dehors des plaques de Peyer, dans les zones extrafolliculaires de l'intestin ; des souris *aly*<sup>-/-</sup> dépourvues de plaques de Peyer et de ganglions lymphatiques ont en effet un nombre de LIEs similaire à celui des souris sauvages (Nanno et *al.*, 1994). Après stimulation antigénique, les LIEs migrent vers les ganglions mésentériques par l'intermédiaire des voies lymphatiques, puis passent dans le sang via le canal thoracique, pour revenir se localiser au niveau de la *lamina propria* puis de l'épithélium intestinal (Arstila et *al.*, 2000; Guy-Grand et Vassalli, 2002).

A l'inverse des LIEs de type "a", les LIEs de type "b" dits thymo-indépendants sont présents chez les souris athymiques, bien que moins nombreux par rapport aux souris sauvages. En effet, le nombre de LIEs TCRγδ<sup>+</sup> CD8αα<sup>+</sup> est réduit d'un facteur 2 à 5 chez les souris athymiques par rapport aux souris sauvages, et cette réduction est encore plus importante pour les LIEs TCRαβ<sup>+</sup> CD8αα<sup>+</sup> (Hayday et *al.*, 2001; Guy-Grand et Vassalli, 2002). Le transfert de cellules souches indifférenciées de la moelle osseuse ou de foie fœtal à des souris athymiques permet la reconstitution de ces animaux en LIEs de type "b" (Poussier et Julius, 1994; Rocha et *al.*, 1994; Lefrançois et Olson, 1997). Ainsi, les LIEs de type "b" ne semblent pas soumis aux mécanismes de sélection thymique. Néanmoins, l'ontogénie précise de ces cellules reste encore très incertaine. L'origine des LIEs de type "b" pourrait être les

"cryptopatches", car le transfert de ces cellules lymphoïdes à des souris SCID conduit à l'apparition de LIEs TCR $\alpha\beta^+$  et de LIEs TCR $\gamma\delta^+$  (Saito et *al.*, 1998; Suzuki et *al.*, 2000). Certaines observations suggèrent que le thymus pourrait tout de même intervenir dans certaines étapes précoces de la maturation des LIEs de type "b" (Lefrançois et Olson, 1994; Lin et *al.*, 1994; Lin et *al.*, 1999) et plusieurs études montrent clairement que les LIEs TCR $\gamma\delta^+$  CD8 $\alpha\alpha^+$  sont soumis à une maturation thymique (Dunon et *al.*, 1993).

En comparaison avec celui des cellules T rencontrées au niveau systémique, le répertoire des LIEs de type "a" est oligoclonal ; il comprend environ 250 clones et sa composition varie selon les souches de souris (Regnault et *al.*, 1994; Guy-Grand et Vassalli, 2002). Le répertoire des LIEs de type "b" est également oligoclonal et utilise un faible nombre de gène V $\gamma$  et V $\delta$ , indiquant que ces LIEs dérivent probablement d'un faible nombre de cellules CD8 $\alpha\alpha^+$  et CD8 $\alpha\beta^+$  (Regnault et *al.*, 1994; Sim, 1995; Guy-Grand et Vassalli, 2002). V $\gamma$ 7 est le gène utilisé de façon prédominante chez la souris en association avec V $\delta$ 4, mais l'usage des gènes semble varier en fonction de l'âge des animaux.

### **D-2.3 Propriétés fonctionnelles des LIEs**

L'analyse des propriétés fonctionnelles des LIEs est difficile à réaliser *in vitro*, en raison de l'impossibilité à recréer la complexité du micro-environnement de l'épithélium intestinal. Néanmoins, des expériences de stimulation *in vitro* à l'aide d'anticorps anti-TCR $\alpha\beta$ , anti-TCR $\gamma\delta$  ou anti-CD3 ont montré que les LIEs prolifèrent peu par rapport aux cellules spléniques ou ganglionnaires (Sydora et *al.*, 1993). Ce défaut de prolifération pourrait s'expliquer entre autre par la sous-représentation du marqueur de co-stimulation CD28 à la surface des LIEs (Ohteki et MacDonald, 1993). Par ailleurs, plusieurs études suggèrent que

l'activation et la prolifération des LIEs semblent dépendre de mécanismes non conventionnels, en particulier pour la population de type "b" (Hayday et *al.*, 2001).

La présence chez la plupart des LIEs, de granules intracytoplasmiques contenant de la perforine et des granzymes, suggère que ces cellules sont capables d'exercer une activité cytotoxique. Plusieurs études ont confirmé cette hypothèse et montré que toutes les sous-populations de LIEs CD8<sup>+</sup> sont potentiellement cytotoxiques (Lefrançois et Goodman, 1989; Viney et *al.*, 1990; Lundqvist et *al.*, 1996; Beagley et Husband, 1998). L'activité cytotoxique des LIEs thymo-dépendants ou thymo-indépendants est induite par les antigènes environnants. Par contre, le mécanisme de cytotoxicité mis en œuvre varie selon les sous-populations de LIEs et fait intervenir le système Fas/FasL, la voie perforine/granzymes, le système Ox40/Ox40L, la molécule CD1d ou bien une activité de type "*natural killer*" NK (Gelfanov et *al.*, 1996; Guy-Grand et *al.*, 1996).

Les LIEs de l'intestin sont également capables de sécréter des cytokines. Ces cellules produisent ainsi spontanément de l'IL-5 et de l'IFN- $\gamma$  (Taguchi, 1991; Yamamoto et *al.*, 1993), tandis qu'elles peuvent sécréter de l'IL-2, de l'IL-3, de l'IL-4, de l'IL-6, de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et du TGF- $\beta$  après stimulation avec un anticorps anti-TCR (Barrett et *al.*, 1992). Le profil des cytokines produites par les LIEs dépend du signal d'activation. La capacité des LIEs à produire une large gamme de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires suggère un rôle important de ces cellules dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale (Lefrançois et *al.*, 1997).



#### D-2.4 Rôle des LIEs dans l'immunité anti-parasitaire

Plusieurs études récentes ont permis de mettre en évidence l'importance des LIEs intestinaux dans la résistance à un certain nombre d'infections parasitaires (McDonald, 1999). Chez la souris, l'inoculation du parasite *Toxoplasma gondii* par la voie orale induit une augmentation transitoire du nombre de LIEs intestinaux de phénotype  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}\alpha\beta^+$  (Chardès et al., 1994). Ces cellules sécrètent de l'IFN- $\gamma$  après stimulation par les antigènes parasitaires et manifestent *in vitro* une activité cytotoxique vis-à-vis d'entérocytes infectés avec *T. gondii* (Chardès et al., 1994). Par ailleurs, le transfert adoptif des LIEs provenant de souris inoculées avec *T. gondii* protège les souris naïves d'une infection létale par ce parasite (Buzoni-Gatel et al., 1997; Lepage et al., 1998). Cette protection est associée à la sous-population de LIEs  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD8}\alpha\beta^+$  et dépend en partie de la production endogène d'IFN- $\gamma$ . De façon similaire, le transfert adoptif des LIEs isolés à partir de souris sauvages infectées par *Cryptosporidium muris* ou *Cryptosporidium parvum* confèrent à des souris SCID une immunité protectrice vis-à-vis de ces parasites (McDonald et al., 1996; Culshaw et al., 1997; Adjei et al., 2000). D'autres études ont également suggéré l'implication des LIEs intestinaux dans la résistance aux parasites du genre *Eimeria* (Yun et al., 2000) et *Giardia* (Ebert, 1999).

# *OBJECTIFS*

L'intérêt pour l'immunobiologie des microsporidies s'est considérablement accru ces dernières années, en raison de l'impact croissant des microsporidioses chez l'homme suite à l'émergence du SIDA. La microsporidie *Encephalitozoon intestinalis* est la cause de diarrhées fréquemment associées à d'autres manifestations (néphrites et rhinites notamment), chez les sujets immunodéprimés infectés par le VIH. La transmission naturelle de ce parasite s'effectue par ingestion orale des spores présentes dans l'environnement, et les entérocytes sont les premières cellules infectées. Par conséquent, la muqueuse intestinale constitue la première barrière physiologique et immunologique s'opposant à la pénétration du parasite dans l'organisme. Cependant, curieusement, la majorité des connaissances acquises concernant l'immunobiologie des microsporidies résulte d'études effectuées chez la souris après infection par la voie intra-péritonéale.

L'immunité protectrice vis-à-vis des microsporidies a été largement associée à la réponse immune cellulaire (lymphocytes T) et à la production de cytokines de type Th1, et plus particulièrement d'IFN- $\gamma$ . Néanmoins, la nature du ou des mécanismes par lesquels celui-ci intervient dans le contrôle des microsporidioses reste encore mal connue.

Notre objectif a donc été d'étudier la réponse immune cellulaire suite à l'inoculation d'*E. intestinalis* par la voie orale. L'immunité cellulaire a été analysée chez les souris sauvages dans plusieurs compartiments (muqueuse intestinale, ganglions mésentériques et rate). Le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la protection contre l'infection par les microsporidies a été appréhendé en utilisant le modèle des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$ . Cette approche devrait nous permettre de mieux cerner le ou les mécanismes par lesquels l'IFN- $\gamma$  participe à la résistance aux microsporidioses.

# *MATÉRIELS ET MÉTHODES*

## **A- Culture cellulaire**

### **A-1 Les cellules RK13**

La lignée RK13 (ATCC CCL37) est une lignée de cellules épithéliales immortalisées, provenant de rein de lapin. Ces cellules adhérentes sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>, en présence de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 3% (volume/volume) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml d'amphotéricine B (Invitrogen). Le milieu de culture est renouvelé tous les deux à trois jours.

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont repiquées dans de nouvelles flasques. Brièvement, le tapis cellulaire est rincé puis incubé à 37°C en présence d'une solution d'EDTA 0,5 mM contenant 0,05% de trypsine (Invitrogen); celle-ci permet de rompre les jonctions cellulaires ainsi que l'adhérence des cellules au plastique de la flasque. La réaction de trypsination est arrêtée par l'ajout de RPMI 1640 3% SVF. Les cellules sont alors récoltées, centrifugées (5 min, 400 g, 4°C) puis remises en suspension dans du milieu de culture contenant 8% de SVF et ensemencées à une densité moindre dans de nouvelles flasques. Pour la cryopréservation, les cellules RK13 sont remises en suspension dans une solution de SVF 10% DMSO puis conservées dans l'azote liquide.

### **A-2 Les entérocytes de la lignée Mode-K**

#### **A-2.1 Description de la lignée**

La lignée cellulaire Mode-K, gracieusement fournie par le Dr Dominique Kaiserlian (Inserm U404, Lyon), a été établie à partir de cellules épithéliales de l'intestin grêle de jeunes

souris C3H/HeJ, après immortalisation par transfert de l'oncogène T du rétrovirus simien SV40 (Vidal et al., 1993). Ces cellules adhérentes sont d'haplotype H-2<sup>k</sup> et présentent toutes les caractéristiques morphologiques et phénotypiques des entérocytes ; elles expriment de façon constitutive la cytokératine, la villine et le composant sécrétoire, mais aussi les molécules du CMH de classe I. De plus, le traitement des cellules Mode-K avec l'IFN- $\gamma$  induit l'expression des molécules du CMH de classe II à leur surface. Ces cellules sont ainsi capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T.

### **A-2.2 Entretien de la lignée**

Les cellules Mode-K sont cultivées à 37°C (atmosphère humide, 5% de CO<sub>2</sub>) en présence de milieu de culture RPMI 1640 contenant 8% (volume/volume) de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de streptomycine et 0,25  $\mu$ g/ml d'amphotéricine B. Lorsqu'elles arrivent à confluence, ces cellules sont trypsinées, centrifugées et ensemencées à une densité moindre dans de nouvelles flasques de culture. Comme pour la lignée RK13, les cellules Mode-K sont cryopréservées dans l'azote liquide après avoir été remises en suspension dans une solution de SVF 10% DMSO.

## **B- Production et purification des spores du parasite**

Tous nos travaux ont été réalisés avec un isolat d'*Encephalitozoon intestinalis* entretenu au laboratoire depuis 1994. Cet isolat a été mis en culture par le Pr Tom van Gool (Academic Medical Center, Amsterdam, Pays-Bas) à partir de selles provenant de patients infectés par le VIH et atteints de microsporidiose intestinale (Van Gool et al., 1994).

*E. intestinalis* est maintenue en culture *in vitro* à 37°C (atmosphère humide, 5% CO<sub>2</sub>) sur des monocouches de cellules RK13, en présence de milieu RMPI 1640 supplémenté avec 8% de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de

streptomycine et 0,25 µg/ml d'amphotéricine B. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. L'état du tapis cellulaire infecté, ainsi que la présence de vacuoles parasitophores dans les cellules et de spores dans le surnageant, sont contrôlés quotidiennement au microscope photonique inversé à contraste de phase. Ainsi, 48 heures après l'infection du tapis cellulaire, des vacuoles parasitophores sont en général visibles dans quelques cellules RK13.

Les spores d'*E. intestinalis* sont récoltées et purifiées par centrifugation différentielle, à partir des surnageants de culture de cellules RK13 infectées. Dans un premier temps, une centrifugation à 400 g et à 4°C pendant 5 min permet d'éliminer les débris cellulaires et les cellules qui se sont détachées du tapis cellulaire. Dans une deuxième étape, le surnageant issu de cette première centrifugation différentielle est centrifugé à 3000 g et à 4°C pendant 20 min. Les spores contenues dans le culot sont resuspendues soit dans du milieu de culture pour permettre l'infection de nouvelles cellules, soit dans du tampon phosphate (PBS) stérile afin d'inoculer des souris.

## **C- Lignées murines**

### **C-1 Description des lignées utilisées**

Les deux principales lignées de souris consanguines utilisées au cours de nos travaux sont la lignée classique de laboratoire 129/Sv, et la lignée de souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  129/Sv GRKO (" *$\gamma$ -interferon receptor knockout*"). Toutes les souris sauvages 129/Sv proviennent des élevages IFFA CREDO et sont exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), notamment de la microsporidie *E. cuniculi* connue pour infecter les élevages de rongeurs.

Les souris 129/Sv GRKO sont génétiquement déficientes pour l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IFN- $\gamma$  (Huang et *al.*, 1993). Ces animaux présentent un développement normal des compartiments lymphoïdes et du système immunitaire ; l'expression des IgM et des marqueurs CD3, CD4 et CD8 à la surface des splénocytes et des thymocytes est identique à celle observée chez les souris sauvages, de même que l'expression des molécules de classe I et II du CMH à la surface des thymocytes, des splénocytes et des macrophages péritonéaux. Néanmoins, ces souris manifestent une susceptibilité accrue à un certain nombre d'infections virales, bactériennes et parasitaires (Huang et *al.*, 1993; van den Broek et *al.*, 1995). La lignée 129/Sv GRKO a été obtenue auprès du *Jackson Laboratory* (Etats-Unis), puis entretenue à la nouvelle animalerie centrale de la Pitié-Salpêtrière.

Pour toutes les lignées, les souris sont maintenues avant et pendant les expériences dans des cages stérilisées, fermées par des couvercles filtrants et placées dans des armoires ventilées munies de filtre à particules. Les litières, l'eau et la nourriture utilisées sont toujours stériles.

## **C-2 Protocole d'infection**

Toutes nos expériences ont été effectuées avec des souris mâles âgées de 8 à 10 semaines au moment de l'infection. La voie orale étant la voie naturelle de contamination par les microsporidies, toutes les souris infectées au cours de nos travaux ont été inoculées par gavage, à l'aide d'une sonde intra-gastrique stérile, avec 250  $\mu$ l d'une solution de PBS stérile contenant  $1 \times 10^7$  spores d'*E. intestinalis* fraîchement récoltées à partir du surnageant de cultures de cellules parasitées. Afin de faciliter l'inoculation des spores, les souris ont été privées de nourriture et d'eau pendant les 12 heures précédant le gavage. Pour chaque



expérience, des souris inoculées oralement avec 250 µl de PBS stérile servent de témoins non infectés.

## **D- Histologie**

Après fixation dans une solution de PBS 10% formaldéhyde (volume/volume), les échantillons d'organes prélevés sur les souris infectées oralement avec *E. intestinalis* et sur les souris témoins non infectées, sont inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 µm sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome puis colorées à l'hématoxyline-éosine et observées au microscope en lumière blanche.

## **E- Préparation de suspension de cellules lymphoïdes à partir d'organes ou de tissus**

### **E-1 Préparation des lymphocytes de la rate et des ganglions mésentériques**

La rate et les ganglions mésentériques de souris naïves ou infectées avec *E. intestinalis* sont prélevés après euthanasie des animaux par élongation des vertèbres cervicales. Les organes sont écrasés entre les extrémités dépolies de deux lames de verres stériles et les cellules sont récupérées dans du PBS stérile. Les suspensions cellulaires obtenues sont filtrées sur tamis cellulaire 0,45 µm (Cell Strainer) pour éliminer les agrégats cellulaires, puis centrifugées à 400 g et à 4°C pendant 5 min. Pour les ganglions, les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture (RPMI 1640 3% SVF). Pour la rate, le culot est repris dans une solution d'ACK pH 7,4 (155 mM NH<sub>4</sub>Cl ; 10 mM KHCO<sub>3</sub> ; 0,1 mM Na<sub>2</sub> EDTA) afin de lyser les érythrocytes. Au bout de 5 min d'incubation à température ambiante, les cellules sont centrifugées à 4°C et à 400 g pendant 5 min après l'ajout d'un grand volume de milieu de culture. Au final, les splénocytes sont remis en suspension dans du RPMI 1640 3%

SVF. Les cellules sont alors dénombrées sur cellule de Malassez et leur viabilité examinée par exclusion du bleu de Trypan.

## **E-2 Purification des lymphocytes intraépithéliaux**

Les lymphocytes intraépithéliaux (LIEs) de la muqueuse de l'intestin grêle sont purifiés selon le protocole mis au point par Guy-Grand (Guy-Grand et *al.*, 1978; Mosley et Klein, 1992).

Brièvement, les intestins grêles de souris naïves ou infectées oralement avec des spores d'*E. intestinalis* sont prélevés après euthanasie des animaux, et le contenu intestinal est éliminé par rinçage avec du tampon PBS. Chaque intestin est ensuite disposé sur un champ stérile, débarrassé de la graisse et des plaques de Peyer, puis divisé en morceaux d'environ deux centimètres de long qui sont ouverts longitudinalement. L'épithélium de la muqueuse est alors gratté superficiellement à l'aide d'un scalpel stérile, puis dissocié par agitation magnétique pendant 15 min dans du milieu complet (RPMI 1640 Glutamax, 8% SVF, 25 mM HEPES) contenant 1 mM de dithioerythritol (Sigma). La suspension cellulaire obtenue est homogénéisée par plusieurs aller/retour à la pipette, puis centrifugée 7 min à 400 g et à 20°C. Le culot est agité pendant 2 min au vortex (dans 3 ml de milieu complet) puis la suspension cellulaire est passée sur une colonne de laine de verre stérile, ce qui permet d'éliminer les amas de cellules épithéliales. Les cellules contenues dans l'éluat à la sortie de la colonne (LIEs + entérocytes) sont lavées par deux centrifugations successives (7 min, 400 g, 20°C), puis les LIEs sont séparés des entérocytes par purification sur un gradient de Percoll 44%-67% (Pharmacia). Après centrifugation à 600 g pendant 20 min, l'anneau de LIEs à l'interface des deux solutions de Percoll est récupéré et les cellules sont lavées plusieurs fois dans du RPMI 1640. Au final, les LIEs sont repris dans du milieu complet puis dénombrés par comptage à l'aide d'une cellule de Malassez.

## F- Cytométrie de flux (FACS)

### F-1 Analyse phénotypique des populations lymphocytaires

Le phénotype des splénocytes, des lymphocytes des ganglions mésentériques et des lymphocytes intraépithéliaux est analysé en cytométrie de flux, après marquage des cellules par immunofluorescence directe. Brièvement,  $1 \times 10^6$  cellules sont incubées en présence du ou des anticorps monoclonaux adéquats dans 50  $\mu$ l de tampon PBS pH 7,4 contenant 3% de SVF, pendant 20 à 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière. Tous les anticorps utilisés ont été obtenus auprès de BD Pharmingen (Tableau 6). Les cellules marquées sont ensuite lavées plusieurs fois avec du PBS 3% SVF, fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 2% (poids/volume, dans du PBS) et conservées à l'obscurité et à 4°C jusqu'à l'analyse. Cette dernière est effectuée sur un FACScan à l'aide du logiciel CellQuest (BD Biosciences, Etats-Unis).

**TABLEAU 6 : Anticorps pour l'analyse phénotypique en cytométrie de flux.**

Spécificité	Fluorochrome	Clone	Isotype
CD3 $\epsilon$	FITC	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, $\kappa$
CD4	FITC ou PE	H129.19	Rat IgG2a, $\kappa$
CD8 $\alpha$	PE	53-6.7	Rat IgG2a, $\kappa$
CD8 $\beta$	FITC	53-6.8	Rat IgG1, $\kappa$
TCR $\beta$	FITC	H57-597	Armenian Hamster IgG1, $\kappa$
TCR $\gamma\delta$	PE	GL3	Armenian Hamster IgG, $\kappa$
CD25	FITC	7D4	Rat IgM, $\kappa$
CD44	FITC	IM7	Rat IgG2b, $\kappa$
CD62L	FITC	MEL-14	Rat IgG2a, $\kappa$
CD69	FITC	H1.2F3	Armenian Hamster IgG1, $\lambda$

## **F-2 Détection des cytokines intracellulaires**

La production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-4 et d'IL-10 par les différentes sous-populations de splénocytes est analysée au niveau cellulaire par la technique de détection des cytokines intracellulaires en cytométrie de flux (Carter et Swain, 1997).

Les splénocytes isolés à partir des rates des souris naïves ou infectées sont remis en suspension dans du milieu RPMI 1640 Glutamax 10% SVF à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules/ml, puis stimulés avec 10 ng/ml de PMA (Sigma), 500 ng/ml d'ionomycine (Sigma) en présence de brefeldine A (GolgiPlug, BD Pharmingen) ou de monensine (GolgiStop, BD Pharmingen). Après 4 heures d'incubation à 37°C (atmosphère humide, 10% de CO<sub>2</sub>), les cellules sont lavées, remises en suspension dans du PBS 1% SVF (50  $\mu$ l /  $1 \times 10^6$  cellules) puis incubées, dans un premier temps avec l'anticorps anti-CD16/CD32 (FcBlock, BD Pharmingen) pendant 10 min à 4°C, et dans un deuxième temps avec l'anticorps anti-CD4 ou anti-CD8 $\alpha$  pendant 20 min à 4°C et à l'abri de la lumière. Après plusieurs lavages, les cellules marquées sont fixées 30 min à l'obscurité avec une solution de paraformaldéhyde à 3% et perméabilisées avec une solution de PBS 1% SVF contenant 0,1% (poids/volume) de saponine. Le marquage des cytokines intracellulaires est réalisé en incubant les cellules dans du tampon de perméabilisation en présence de l'anticorps anti-cytokine adéquat (BD Pharmingen), pendant 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière (Tableau 7). Les cellules sont ensuite lavées puis conservées à 4°C et à l'obscurité dans le tampon de perméabilisation jusqu'à l'analyse sur FACScan.

**TABLEAU 7 : Anticorps pour la détection des cytokines intracellulaires en cytométrie de flux.**

Spécificité	Fluorochrome	Clone	Isotype
IFN- $\gamma$	FITC	XMG1.2	Rat IgG1
TNF- $\alpha$	FITC	MP6-XT22	Rat IgG1
IL-4	PE	11B11	Rat IgG1
IL-10	FITC	JES5-16E3	Rat IgG2b

## G- Méthodes d'extraction des acides nucléiques

### G-1 Extraction de l'ADN génomique

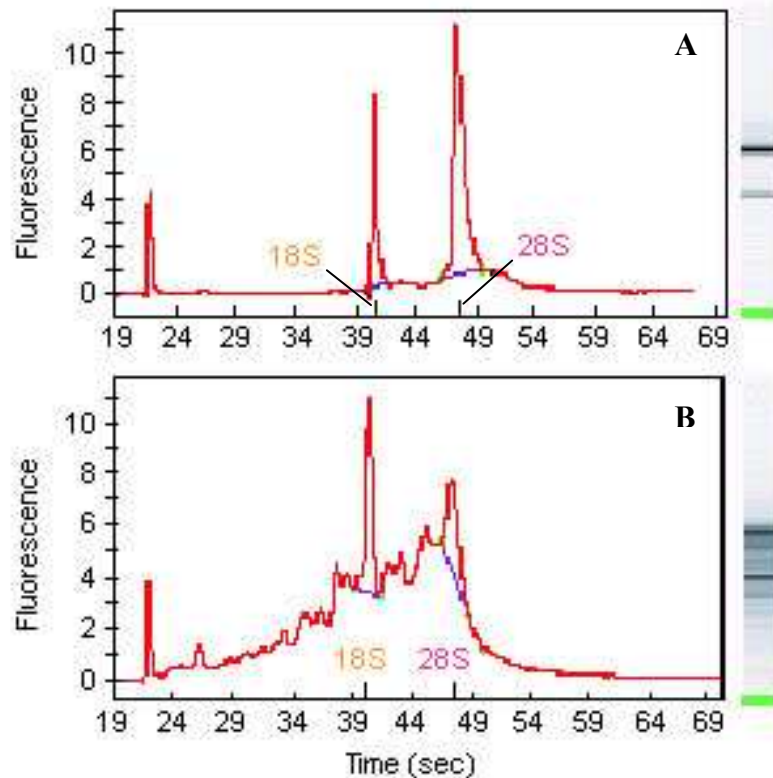
L'ADN génomique est extrait à partir de différents organes (duodénum, foie et reins) prélevés sur les souris naïves ou infectées avec *E. intestinalis*. Brièvement, les échantillons tissulaires (environ 200-300 mg) sont broyés dans un tampon (100 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8 ; 25 mM EDTA pH 8 ; 0,5% SDS) contenant 0,1 mg/ml de protéinase K (Eurobio), puis incubés à 50°C pendant 12 heures sous agitation lente. Cette étape de lyse est suivie d'une extraction au phénol-chloroforme puis d'une centrifugation à 3000 g et à 4°C pendant 10 min. L'ADN est ensuite précipité à partir de la phase aqueuse à l'aide d'acétate d'ammonium 7,5 M en présence de deux volumes d'éthanol absolu. Après 20 min de centrifugation à 10 000 g et à 4°C, le culot d'ADN est lavé plusieurs fois avec de l'éthanol 70%, séché puis dissout dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). La quantité d'ADN extrait est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm sachant qu'une unité d'absorbance à cette longueur d'onde correspond à une concentration d'ADN de 50  $\mu$ g/ml. Par ailleurs, la pureté de l'ADN est évaluée en calculant le rapport entre l'absorbance à 260 nm et celle à 280 nm. Un échantillon d'ADN est considéré comme pur lorsque ce rapport est compris entre 1,6 et 1,8.

Selon le même principe, l'ADN est également extrait d'un lysat obtenu à partir d'un mélange de 75 mg de foie de souris non infectée et d'un nombre connu de spores d'*E. intestinalis*, en utilisant le kit commercial *Easy-DNA kit* (Invitrogen).

## **G-2 Extraction des ARN totaux**

Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules Mode-K en culture ou à partir de différents organes (rate, ganglions mésentériques, duodénum) prélevés sur les souris infectées ou non avec *E. intestinalis* et immédiatement congelés dans l'azote liquide. L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi à l'aide du TRIzol (Invitrogen), solution commerciale contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidium (Chomczynski et Sacchi, 1987).

Dans un premier temps, les échantillons de tissus congelés sont pulvérisés dans l'azote liquide, dispersés dans le TRIzol puis homogénéiser à l'aide d'un broyeur ultra-turrax. Dans le cas des cellules Mode-K, le tapis cellulaire est lysé par l'ajout de TRIzol directement dans les puits des plaques de culture, puis les agrégats insolubles sont éliminés grâce à un filtre QIAshredder (Qiagen). Les lysats tissulaires ou cellulaires obtenus sont traités avec 0,2 volume de chloroforme pendant 3 min à température ambiante, agité au vortex puis centrifugés pendant 15 min à 12 000 g et à 4°C. Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont ensuite précipités avec de l'isopropanol en présence d'ARNt pendant 10 min à température ambiante et sédimentés par une centrifugation à 12 000 g et à 4°C pendant 10 min. Le culot d'ARN est alors lavé avec de l'éthanol 75%, séché et finalement resuspendu dans de l'eau traitée au DEPC.



**FIGURE 7 : Analyse de la qualité des ARN totaux sur puce Agilent (*RNA LabChip*).** Les puces Agilent sont des lames de verres comportant un réseau de capillaires, dans lequel est injecté un gel d'acrylamide contenant un marqueur fluorescent des acides nucléiques. Les échantillons d'ARN à tester, ainsi qu'une solution de marqueurs de taille (servant de témoin de calibration), sont dénaturés puis déposés dans chacun des puits de la puce, qui est ensuite disposée dans un BioAnalyser 2100. Sous l'effet d'un courant électrique, les ARN vont alors migrer et passer devant un capteur qui mesure l'intensité de la fluorescence. Le logiciel d'analyse couplé à l'appareil permet de tracer une représentation de l'intensité de fluorescence (corrélée à la quantité d'ARN) en fonction du temps de migration. La qualité des ARN est déduite de la valeur du rapport entre l'aire du pic correspondant à l'ARNr 28S et celle du pic correspondant à l'ARNr 18S. Lorsque l'intégrité des ARN a été conservée durant l'extraction, ce rapport est proche de 2. **A** : profil d'ARN non dégradés ; **B** : profil d'ARN dégradés.

La concentration d'ARN est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm, sachant qu'une unité d'absorbance à cette longueur d'onde correspond à une concentration d'ARN de 40 µg/ml. La contamination en protéine est évaluée en calculant le rapport entre l'absorbance à 260 nm et celle à 280 nm, sachant qu'un échantillon d'ARN est considéré comme pur

lorsque le rapport est proche de 1,8. Par ailleurs, la qualité des ARN extraits est analysée sur BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies) après dépôt sur une puce *RNA LabChip* (Figure 7).

## H- PCR en temps réel ("*real-time PCR*")

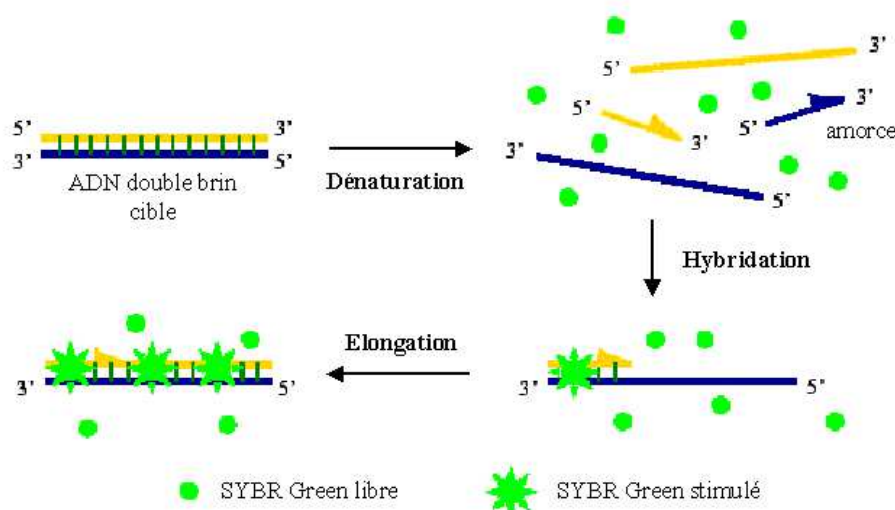
### H-1 Principe de la technique

La technique de PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent ("*reporter*") durant le processus d'amplification (Higuchi et *al.*, 1993). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés au cours de la réaction de PCR, elle-même proportionnelle au nombre de copies de la séquence cible initialement présentes dans l'échantillon. En mesurant l'intensité de la fluorescence émise à chaque cycle d'amplification, il devient alors possible de suivre la réaction de PCR durant sa phase exponentielle.

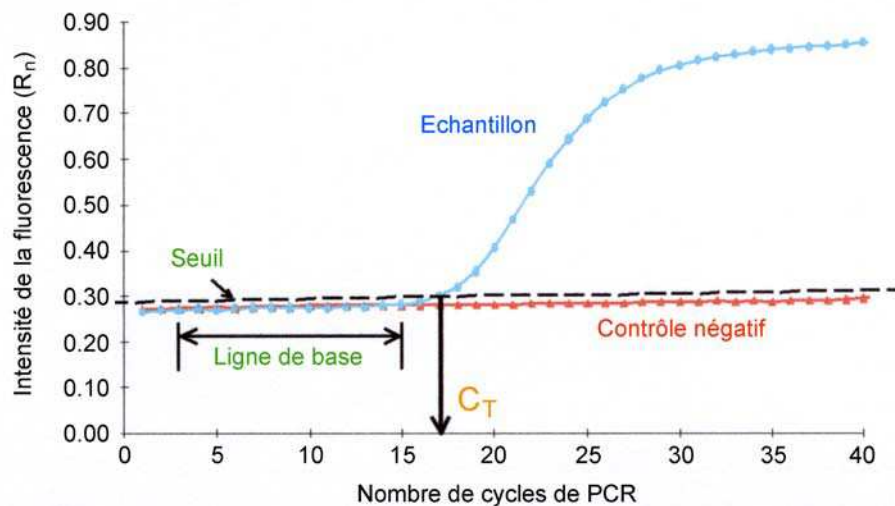
Il existe deux grands principes pour la détection quantitative du produit de PCR : les molécules se liant à l'ADN double brin et les sondes fluorescentes spécifiques de la séquence cible amplifiée (Bustin, 2000). Nous avons utilisé la technologie du SYBR Green I, agent intercalant des bases de l'ADN, dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il se lie de façon non spécifique à l'ADN double brin (Figure 8).

La quantification par PCR en temps réel repose sur le concept de "*cycle threshold*" ou cycle seuil  $C_T$  (Gibson et *al.*, 1996; Heid et *al.*, 1996). Le  $C_T$  est définie comme le nombre de cycles d'amplification requis pour que l'intensité de la fluorescence atteigne un niveau statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Figure 9). Ce point apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la réaction d'amplification. La valeur du  $C_T$  est d'autant plus faible que la quantité de matrice à amplifier initialement présente dans l'échantillon est importante.





**FIGURE 8 : Utilisation du SYBR Green I en PCR en temps réel.** Le SYBR Green I est un agent intercalant, dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il se lie de façon non spécifique à l'ADN double brin. Au cours de la phase d'élongation de chaque cycle d'amplification, l'intensité du signal fluorescent augmente, suite à la fixation, au double brin d'ADN naissant, d'un nombre croissant de molécules de SYBR Green I au fur et à mesure de la progression de l'ADN polymérase.

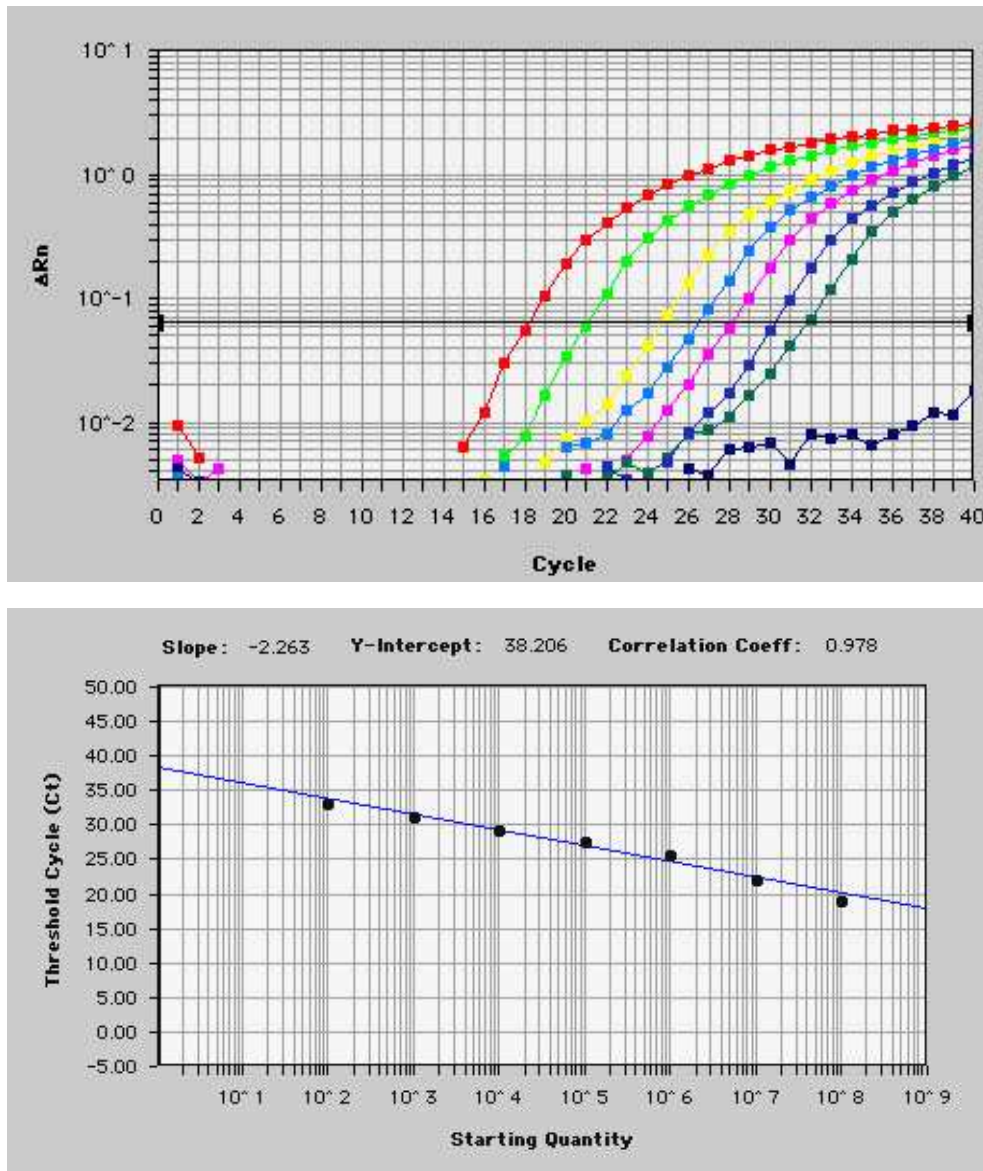


**FIGURE 9 : Principe de la quantification par PCR en temps réel.** Pour chaque échantillon testé, une valeur  $C_T$  ("cycle threshold") est déterminée ; elle correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour que la fluorescence atteigne un niveau seuil, statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (ligne de base). Plus la quantité de matrice cible initialement présente dans l'échantillon à tester est importante, plus la valeur du  $C_T$  sera faible.

## H-2 Quantification de la charge parasitaire

La dissémination d'*E. intestinalis* est analysée chez les souris sauvages et chez les souris GRKO en quantifiant la charge parasitaire dans différents organes par PCR en temps réel. L'ADN parasitaire est détecté grâce aux amorces V1 (CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC) et EI500 (CTCGCTCCTTTACACTCG), qui permettent d'amplifier spécifiquement une séquence de 382 pb du gène codant pour l'ARNr 16S d'*E. intestinalis* (Weiss et al., 1994). La réaction de PCR est réalisée dans une plaque 96 puits à partir de 500 ng d'ADN, en présence de 0,5  $\mu$ M de chaque amorce et de 12,5  $\mu$ l de *SYBR Green PCR master mix* 2 $\times$  (volume réactionnel de 25  $\mu$ l). Le *SYBR Green PCR master mix* (Applied Biosystem) est un mélange réactionnel prêt à l'emploi, qui contient la *Taq* polymérase, les dNTPs, le SYBR Green I dans un tampon optimisé. Outre les échantillons à tester, chaque plaque 96 puits contient également des témoins négatifs (eau ultra-pure) et positifs (ADN génomique d'*E. intestinalis*), ainsi qu'une série d'échantillons d'ADN servant de standards pour la quantification du parasite (Figure 10). Tous les échantillons sont testés en double. L'amplification s'effectue sur un appareil *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystem) dans les conditions thermiques suivantes : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C, puis 40 cycles formés par la succession d'une étape de 15 secondes à 95°C et d'une étape d'1 min à 60°C.

A la fin de la PCR, l'analyse des données recueillies durant l'amplification est effectuée à l'aide du logiciel SDS version 1.6.3 (Applied Biosystem) et la valeur du  $C_T$  est déterminée pour chacun des échantillons. Une courbe étalon représentant le  $C_T$  en fonction du nombre de spores est tracée à partir des résultats obtenus pour les échantillons standards (Figure 10), puis utilisée pour calculer la charge parasitaire (exprimée en nombre de spores) dans les différents échantillons testés provenant des souris infectées.



**FIGURE 10 : Gamme et courbe étalon pour la quantification de la charge parasitaire par PCR en temps réel.** L'ADN génomique est extrait à partir d'une série d'homogénats obtenus en mélangeant 75 mg de foie de souris naïve avec un nombre connu de spores d'*E. intestinalis* ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  spores). Ces échantillons d'ADN standards, inclus dans chaque plaque 96 puits, permettent de tracer après régression linéaire une courbe étalon représentant la valeur du  $C_T$  en fonction du nombre de parasite. La charge parasitaire est alors calculée pour chaque échantillon testé à partir de la valeur du  $C_T$  en référence à cette courbe étalon.

## H-3 Quantification de l'expression des ARNm par PCR en temps réel après transcription inverse (RT-PCR)

L'expression des ARNm spécifiques de différents gènes (cytokines, chimiokines et iNOS) est quantifiée chez les souris infectées avec *E. intestinalis* par PCR en temps réel après une étape de transcription inverse, en utilisant la technique du SYBR Green I.

### H-3.1 Synthèse des ADNc

Dans un premier temps, les préparations d'ARN totaux sont traitées à la DNase I ("*RNase-free DNase I*", Roche ; 10 U/ $\mu$ g d'ARN) pendant 30 min à 37°C, afin de digérer l'ADN génomique contaminant éventuellement présent. La DNase I est ensuite éliminée à l'aide d'une mini-colonne *RNeasy* (Qiagen) en suivant le protocole de "*clean-up*" selon les indications du fabricant et l'absence d'ADN génomique est testée en utilisant directement (sans étape de transcription inverse) les ARN traités comme matrice pour une PCR à l'aide d'amorce spécifique du GAPDH murin.

Le brin d'ADNc est ensuite synthétisé par transcription inverse à partir de 5 $\mu$ g d'ARN totaux traités à la DNase I, grâce au kit commercial *First Strand RT-PCR* (Stratagene). Dans une première étape, les ARN sont dénaturés 5 min à 65°C en présence de 300 ng d'oligo(dT), puis refroidis à température ambiante pendant environ 10 min (étape d'hybridation des oligo(dT) sur les extrémités polyadénylées des ARNm). Les ARN sont ensuite incubés pendant 1 heure à 42°C, en présence de 50 U de transcriptase inverse du MMLV ("*Moloney murine leukemia virus*"), de 25 mM de chaque dNTPs et de 40 U de RNasin ("*ribonuclease inhibitor*") dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ l. A la fin de la réaction de transcription inverse, une étape de 5 min à 90°C permet de dénaturer la transcriptase inverse. Les ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation comme matrice pour la PCR en temps réel.

### H-3.2 Quantification des ADNc par PCR en temps réel

Pour chaque échantillon d'ADNc, plusieurs réactions de PCR sont réalisées en parallèle et en doublon dans une plaque 96 puits, en utilisant différents couples d'amorces spécifiques de différents gènes (Tableau 8). L'amplification est effectuée sur un appareil *ABI Prism 7700 Sequence Detection System*, dans un volume réactionnel de 25 µl contenant : une quantité d'ADNc correspondant à 200 ng d'ARN totaux, 0,5 µM de chaque amorce et 12,5 µl de *SYBR Green PCR master mix 2x*. Chaque échantillon d'ADNc sert également de matrice pour une PCR à l'aide d'amorces spécifiques du gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (GAPDH) ; ce gène de ménage dont l'expression est constitutive et stable, est utilisé pour évaluer la quantité initiale d'ADNc présents dans chaque échantillon et normaliser les résultats. Des témoins négatifs (eau ultra-pure) et positifs (ADN génomique de souris) sont inclus dans chaque plaque 96 puits. Les conditions thermiques de l'amplification sont identiques quel que soient les amorces utilisées : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C puis 40 cycles constitués de la succession d'une étape de 15 secondes à 95°C et d'une étape d'1 min à 60°C.

Après l'amplification, les valeurs des  $C_T$  spécifiques des différents gènes étudiés et du gène de ménage GAPDH sont déterminées à l'aide du logiciel SDS (version 1.6.3) pour chaque échantillon. La quantité d'ADNc spécifique d'un gène donné est alors calculée, relativement à un échantillon choisi comme référence et après normalisation par rapport à la quantité d'ADNc spécifique du GAPDH, en utilisant la formule  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  où :

$$\Delta\Delta C_T = [C_T(\text{gène}) - C_T(\text{GAPDH})]_{\text{échantillon}} - [C_T(\text{gène}) - C_T(\text{GAPDH})]_{\text{référence}}$$

Dans notre cas, les échantillons d'ADNc des souris témoins non infectées sont utilisés comme références.

**TABLEAU 8 : Séquences (5'→3') des amorces utilisées pour l'amplification des ADNc spécifiques de divers gènes par PCR en temps réel.**

Spécificité	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>Cytokines</i>		
IFN- $\gamma$	AGCTCTGAGACAATGAACGC	GGACAATCTCTTCCCCACCC
TNF- $\alpha$	CTGAACTTCGGGGTGATCGG	GTATGAGATAGCAAATCGGC
IL-2	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA	TCCAGAACATGCCGCAGAG
IL-12p40 *	GGAAGCACGGCAGCAGAATA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
IL-18	ACTGTACAACCGCAGTAATACGG	AGTGAACATTACAGATTTATCCC
IL-4 *	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
IL-5 *	AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT	TCCAATGCATAGCTGGTGATTT
IL-10	GCCTTATCGGAAATGATCCA	TTTTACAGGGGAGAAATCG
iNOS *	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>Chimiokine C</i>		
Lymphotactin	CCCAGCAAGACCTCAGCCATGA	TGAGGAAACATTGTCTGGAGGC
<i>Chimiokines C-C</i>		
MCP-1	AGGTCCTGTCATGCTTCTG	GTGCTGAAGACCTTAGGGCA
MIP-1 $\alpha$	AAGCAGCAGCGAGTACCAGT	CTCAAGCCCCTGCTCTACAC
MIP-1 $\beta$	GCTCTGTGCAAACCTAACCC	AAGAAGAGGGGCAGGAAATC
RANTES	CCCTCACCATCATCCTCACT	ATTTCTTGGGTTTGCTGTGC
TCA-3	CTTGGCTCCACCAGACATTC	TGGAGGACTGAGGGAAACTG
<i>Chimiokines C-X-C</i>		
IP-10	CCTATCCTGCCCACGTGTTGAG	CGCACCTCCACATAGCTTACAG
MIG	GATCAAACCTGCCTAGATCC	GGCTGTGTAGAACACAGAGT
i-TAC #	CCATAGCCCTGGCTGCGATC	CCAAGACAGCAGAGGGTCCG
KC	GACGAGACCAGGAGAAACAGGG	AACGGAGAAAGAAGACAGACTGCT
MIP-2	TCCAGAGCTTGAGTGTGACG	GCCATCCGACTGCATCTATT
GAPDH	ACCACCATGGAGAAGGCTGG	CTCAGTGTAGCCCAGGATGC

Les amorces (Invitrogen) ont été choisies sur la base de publications antérieures ou bien à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystem). Parmi les critères de sélection, dans la mesure du possible, la taille des amorces est comprise entre 20 et 30 pb, le pourcentage de GC entre 30% et 80% et le Tm est de l'ordre de 57-60°C. Dans tous les cas, chaque amorce d'un même couple s'hybride sur des exons différents, afin de discriminer les faux positifs pouvant résulter de l'amplification d'ADN génomique contaminant. (\*) (Overbergh et al., 1999) ; (#) (Lacroix-Lamande et al., 2002)

Pour chaque PCR, la spécificité de la réaction d'amplification est vérifiée par électrophorèse après dépôt d'un aliquot de chaque produit de PCR sur un gel d'agarose à 1% (poids/volume) équilibré avec du tampon TAE 1× (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) et coloré au bromure d'éthidium.

## **I- Test de cytotoxicité in vitro**

Le pouvoir cytotoxique des lymphocytes intraépithéliaux et des splénocytes provenant de souris sauvages 129/Sv et/ou de souris 129/Sv GRKO inoculées oralement avec des spores d'*E. intestinalis*, a été testé grâce à la technique de relargage du  $^{51}\text{Cr}$ , en utilisant comme cellules cibles des macrophages péritonéaux de souris parasités par *E. intestinalis*.

### **I-1 Préparation, infection et marquage des macrophages péritonéaux**

Des souris 129/Sv sauvages sont injectées par la voie intrapéritonéale avec 2 ml d'une solution de thioglycolate à 3% (poids/volume), afin de provoquer un afflux de macrophages dans la cavité péritonéale. Trois jours plus tard, les animaux sont sacrifiés et les macrophages sont récupérés par la technique des lavages péritonéaux avec du milieu de culture sans SVF. Après plusieurs lavages dans du RPMI 1640, les macrophages viables sont comptés sur une cellule de Malassez par exclusion du bleu de Trypan, puis mis en culture dans un plaqué 96 puits à fond rond, à raison de  $5 \times 10^4$  cellules par puits dans 100  $\mu\text{l}$  de milieu (RPMI 1640 Glutamax, 25 mM HEPES, 8% SVF).

Après une nuit à 37°C (5% CO<sub>2</sub>, atmosphère humide), les cellules non adhérentes sont éliminées par plusieurs lavages et les macrophages péritonéaux sont infectées avec des spores fraîches d'*E. intestinalis* ( $2 \times 10^5$  spores/puits). Au bout de 48 h d'infection, chaque puits est

abondamment lavé pour éliminer les parasites extracellulaires et les macrophages sont ensuite marqués avec du  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (2  $\mu\text{Ci/puits}$ ) pendant 2 h à 37°C. Après plusieurs lavages pour enlever l'excès de  $^{51}\text{Cr}$  non incorporé, 100  $\mu\text{l}$  de milieu RPMI 1640 Glutamax contenant 25 mM HEPES et 8% de SVF sont ajoutés dans chaque puits.

## **I-2 Séparation des lymphocytes $\text{CD8}\alpha^+$**

Les cellules  $\text{CD8}\alpha^+$  sont purifiées à partir des suspensions de LIEs ou de splénocytes en utilisant le système MiniMACS (Miltenyi Biotech). Dans une première étape,  $1 \times 10^7$  LIEs ou splénocytes repris dans 90  $\mu\text{l}$  de tampon PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA sont incubés pendant 15 min à 4°C, en présence de 10  $\mu\text{l}$  d'un anticorps anti- $\text{CD8}\alpha^+$  couplé à des microbilles magnétiques (BD Pharmingen). Après le marquage, les cellules sont lavées dans un grand volume de tampon PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA. La suspension cellulaire est ensuite passée sur une colonne MACS  $\text{MS}^+$  (Miltenyi Biotech) soumise à un champ magnétique (grâce à un aimant), qui retient les cellules  $\text{CD8}\alpha^+$  et laisse passer les cellules  $\text{CD8}\alpha^-$ . Après avoir soustrait la colonne du champ magnétique, les cellules  $\text{CD8}\alpha^+$  sont éluées avec 1 ml de tampon PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA, puis lavées plusieurs fois avec du RPMI 1640 et dénombrées. La pureté de la préparation de cellules  $\text{CD8}\alpha^+$  obtenue est analysée en FACS après un marquage en immunofluorescence directe.

## **I-3 Mesure de la cytotoxicité**

La suspension de LIEs ou de splénocytes  $\text{CD8}\alpha^+$  est ajustée à la concentration désirée et 100  $\mu\text{l}$  sont répartis dans chaque puits de la plaque contenant les macrophages péritonéaux infectés par *E. intestinalis*. Après 4 h d'incubation à 37°C (5% de  $\text{CO}_2$  et atmosphère humide), la plaque 96 puits est centrifugée et les surnageants de culture sont récupérés sur des



filtres. Après l'ajout de liquide scintillant, le nombre de coups par minute (cpm) dûs aux rayonnements  $\gamma$  émis par le  $^{51}\text{Cr}$  est mesuré pour chaque surnageant, à l'aide d'un compteur à scintillation liquide. Le pourcentage de lyse spécifique est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\frac{[\text{CPM}(\text{échantillon}) - \text{CPM}(\text{relargage spontané})]}{[\text{CPM}(\text{relargage maximum}) - \text{CPM}(\text{relargage spontané})]} \times 100$$

Le relargage spontané et le relargage maximum représentent respectivement le relargage du  $^{51}\text{Cr}$  par les macrophages incubés avec du milieu de culture et par les macrophages incubés avec du milieu de culture puis lysés à l'aide d'une solution de Triton X100 à 5%.

## **J- Dosage des nitrites par la réaction de Griess**

Les nitrites sont des composés stables dont la présence reflète la production de monoxyde d'azote (NO) à partir de la L-arginine sous l'action de l'activité enzymatique NO synthase.

La quantité de nitrites dans les surnageants de culture cellulaire est mesurée en utilisant la réaction colorimétrique de Griess (Green et al., 1982). Brièvement, 50  $\mu\text{l}$  de chaque surnageant de culture à doser sont répartis dans chaque puits d'une plaque 96 puits, puis incubés dans un premier temps avec 50  $\mu\text{l}$  d'une solution de sulfanilamide à 1% (poids/volume, dilué dans de l'acide chlorhydrique HCl 1N), pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Dans une seconde étape, 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de N- $\alpha$ -naphtyléthylènediamine à 0,5% (poids/volume, dilué dans l'HCl 1N) sont ajoutés au contenu de chaque puits. Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique à 570 nm de chaque puits est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. La concentration de nitrites dans chaque surnageant est déterminée en comparant les valeurs de densité optique obtenues avec celle d'une gamme étalon standard (0 à 500  $\mu\text{M}$  de

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), préparée à partir d'une solution de nitrite de sodium NaNO<sub>2</sub> dilué dans du milieu de culture RPMI 1640 et incubée en parallèle avec les mêmes réactifs.

## **K- Analyse statistique des résultats**

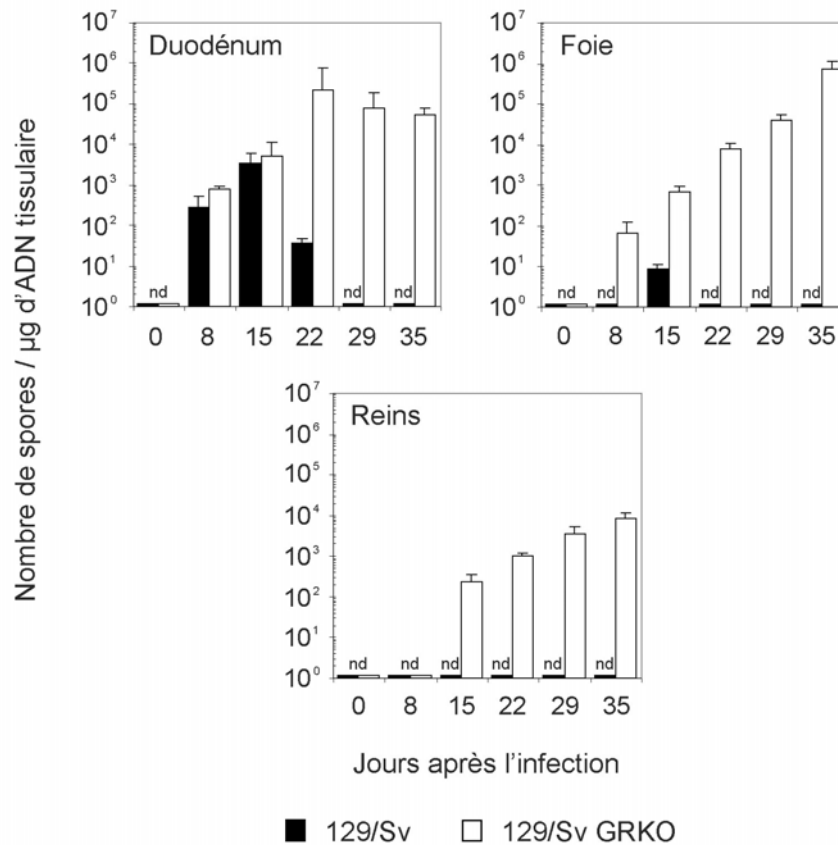
Pour toutes les expériences, les résultats sont exprimés dans la mesure du possible sous la forme d'une moyenne  $\pm$  écart type. Les valeurs moyennes sont ensuite comparées par le test *t* de Student en utilisant le logiciel Statview 4.5. Les tests statistiques sont considérés comme significatifs pour une valeur de  $p < 0,05$ .

# *RÉSULTATS*

## A- Données parasitologiques et histologiques

Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que les souris 129/Sv déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  (129/Sv GRKO), inoculées par la voie orale avec des spores d'*E. intestinalis*, sont incapables d'éradiquer le parasite et développent une infection chronique et disséminée, comme en témoignent : 1) la présence continue et en nombre croissant de spores dans les selles ; 2) la détection par PCR de l'ADN parasitaire au niveau du duodénum, du foie, des reins et même dans certains cas du cœur et du cerveau (Achbarou *et al.*, 1996; El Fakhry *et al.*, 2001). A l'inverse, les souris sauvages 129/Sv éliminent le parasite dans les 2 à 3 premières semaines suivant l'inoculation des spores, et l'infection demeure localisée au niveau du duodénum.

Pour confirmer ces résultats antérieurs, nous avons quantifié par PCR en temps réel, la charge parasitaire dans divers tissus (duodénum, foie, reins) prélevés à différents jours post-infection (p.i.) chez les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO, inoculées oralement avec  $1 \times 10^7$  spores d'*E. intestinalis*. Les résultats obtenus montrent que chez les souris 129/Sv la multiplication d'*E. intestinalis* demeure essentiellement localisée au niveau du duodénum (Figure 11). L'ADN parasitaire est ainsi détecté dès le 8<sup>ème</sup> jour après l'inoculation des spores chez ces animaux et l'infection atteint son maximum au jour 15 p.i., puis diminue pour disparaître complètement à partir du 29<sup>ème</sup> jour p.i.

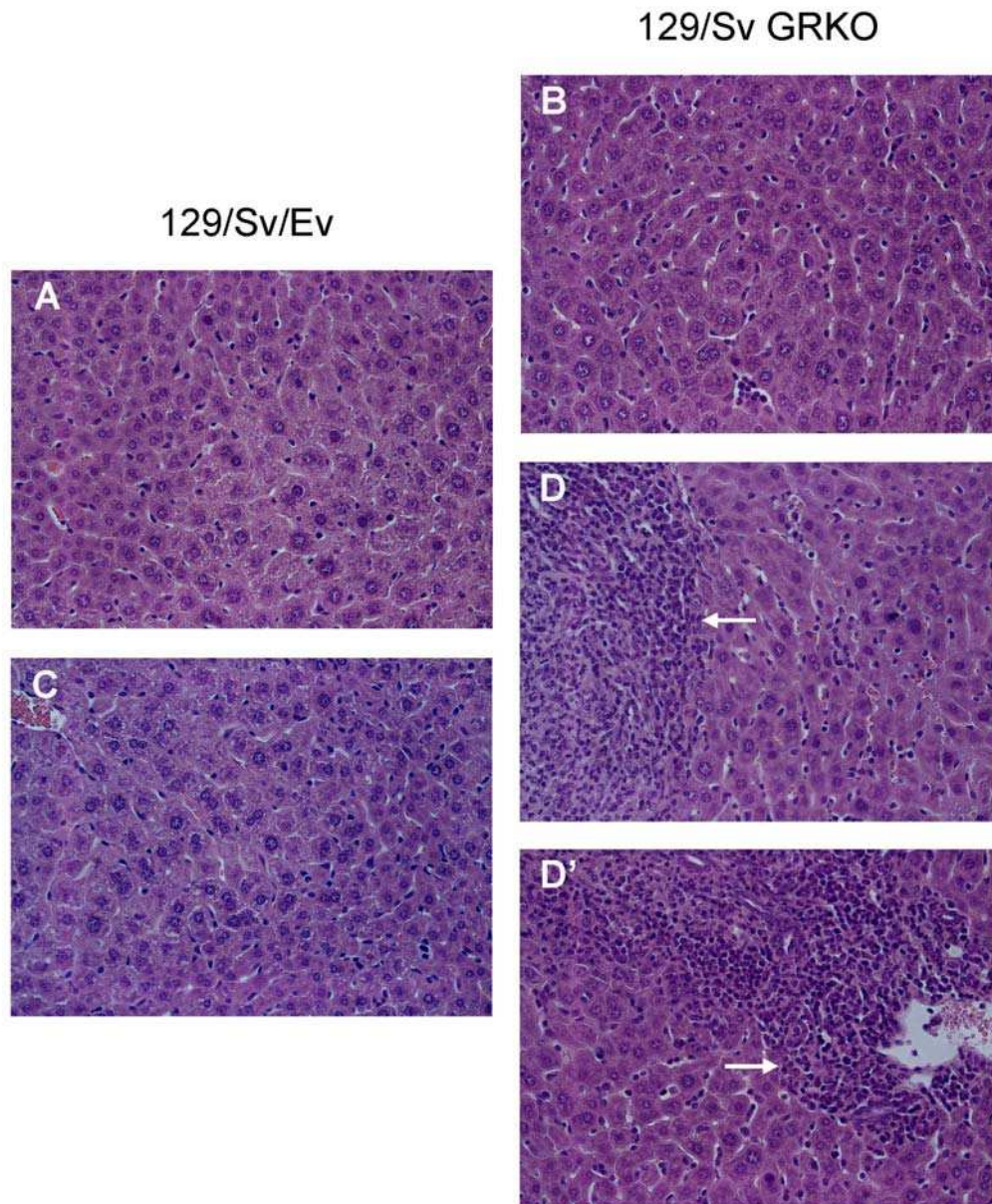


**FIGURE 11 : Evolution de la charge parasitaire chez les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO infectées oralement avec *E. intestinalis*.** Le duodénum, le foie et les reins sont prélevés chez les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO à différents jours p.i., et la charge parasitaire est évaluée par PCR quantitative en temps réel après extraction de l'ADN génomique. Les histogrammes représentent le charge parasitaire moyenne (exprimée en nombre de spores/µg d'ADN tissulaire) ± l'écart type ; pour chaque point, l'analyse a été réalisée à partir de 3 souris. Les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO non infectées servent de témoins (jour 0). Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes ayant donné des résultats similaires. nd : ADN parasitaire non détecté par PCR.

Chez les souris 129/Sv GRKO, le parasite est également détecté au niveau du duodénum dès le 8<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation des spores ; il est intéressant de noter que l'intensité de l'infection est alors identique à celle observée chez les souris sauvages. Néanmoins, alors que l'infection du duodénum est transitoire chez les souris 129/Sv, le nombre de parasites détectés par PCR augmente progressivement dans le duodénum des souris 129/Sv GRKO pour atteindre un pic au jour 22 p.i. (Figure 11). Par ailleurs, nos résultats reflètent également la

dissémination d'*E. intestinalis* à d'autres organes chez les souris 129/Sv GRKO. En effet, l'ADN parasite est détecté en quantité croissante au niveau du foie et des reins prélevés sur ces animaux, respectivement à partir du jour 8 p.i et du jour 15 p.i. (Figure 11). L'ensemble de ces observations confirme donc la susceptibilité accrue des souris 129/Sv GRKO à l'infection orale avec *E. intestinalis*.

Les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO ne développent aucun signe clinique suite à l'inoculation des spores d'*E. intestinalis*. Néanmoins, l'observation des organes lors de la dissection de ces animaux révèlent la présence de lésions macroscopiques au niveau du foie et des reins des souris 129/Sv GRKO à partir du 29<sup>ème</sup> jour suivant l'infection. L'étude de coupes histologiques de foie montre en effet la présence de nodules inflammatoires, constitués de cellules mononucléées, dans le parenchyme hépatique des souris 129/Sv GRKO infectées depuis 35 jours (Figure 12, photos D et D'). Par contre, aucune lésion inflammatoire n'est observée sur les coupes histologiques de foie de souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO non infectées (Figure 12, photos A et B) ou de souris 129/Sv infectées depuis 35 jours (Figure 12, photo C).



**FIGURE 12 : Coupes histologiques de foie prélevé chez les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO, 35 jours après l'inoculation de spores d'*E. intestinalis* par la voie orale. A : foie de souris 129/Sv non infectée (témoin). B : foie de souris 129/Sv GRKO non infectée (témoin). C : foie de souris 129/Sv 35 jours après l'infection. D et D' : foie de souris 129/Sv GRKO 35 jours après l'infection ; noter la présence d'important nodules inflammatoires constitués de cellules mononucléées.**

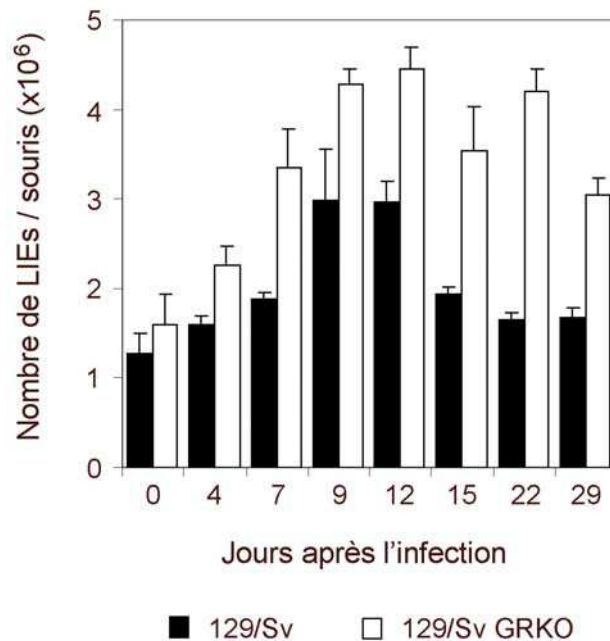
## **B- Etude de la réponse immune cellulaire locale suite à l'infection orale par *Encephalitozoon intestinalis***

Suite à une infection orale, les entérocytes de la muqueuse intestinale constituent les premières cellules infectées par *E. intestinalis*. Par conséquent, l'épithélium intestinal forme la première barrière physiologique rencontrée par le parasite et les lymphocytes intraépithéliaux la première ligne de défense immunitaire spécifique. Dans une première étape, nous nous sommes donc intéressés à la réponse immune cellulaire mise en place au niveau de la muqueuse intestinale chez les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO, suite à l'inoculation par la voie orale de spores d'*E. intestinalis*. Dans cet objectif, nous avons analysé 1) la dynamique des lymphocytes intraépithéliaux (LIEs); 2) les propriétés fonctionnelles de ces LIEs; et 3) la réponse cytokine et chimiokine au niveau de la muqueuse intestinale.

### **B-1 Evolution du nombre de lymphocytes intraépithéliaux et de leur phénotype**

Afin de suivre la mise en place de la réponse immunitaire intestinale suite à l'inoculation *per os* des spores d'*E. intestinalis*, les LIEs ont été purifiés à partir des intestins grêles des souris 129/Sv et 129/Sv GRKO prélevés à différents jours post-infection (p.i.). Le nombre de LIEs et leur phénotype ont ensuite été déterminés, respectivement par comptage et par analyse en cytométrie de flux après un marquage en immunofluorescence directe.





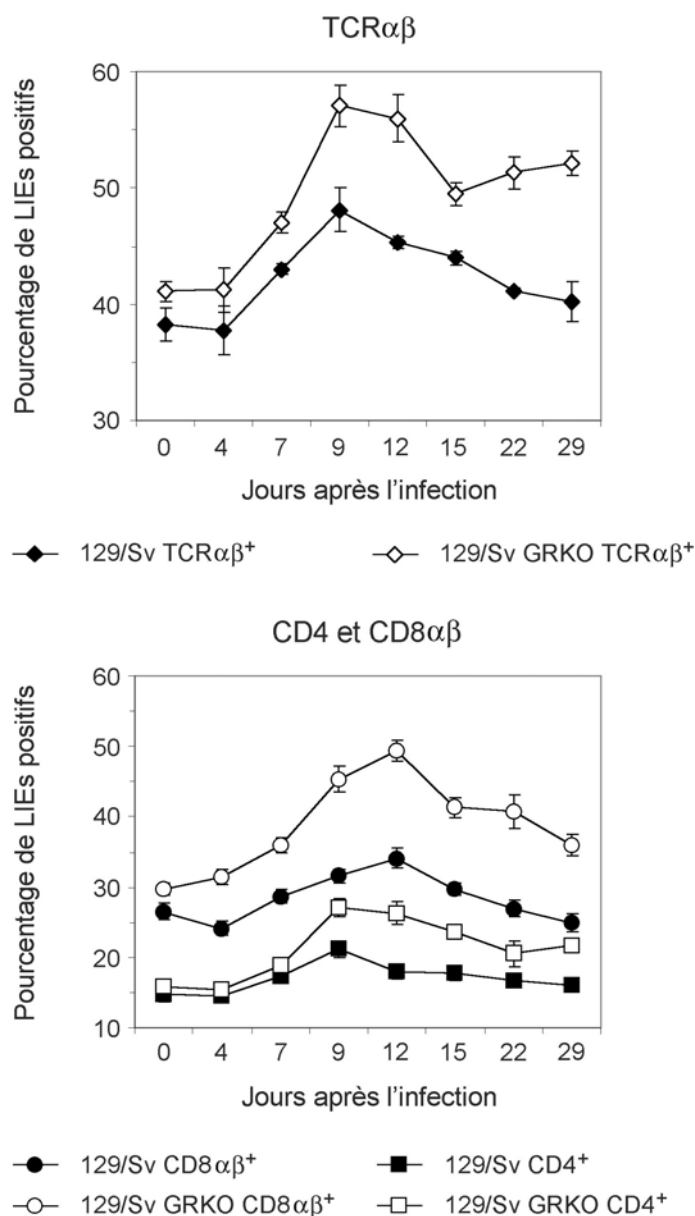
**FIGURE 13 : Nombre de lymphocytes intraépithéliaux (LIEs) suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** Chaque histogramme représente le nombre moyen ( $\times 10^6$ ) de LIEs ( $\pm$  l'écart-type), extraits à partir de l'intestin grêle de souris 129/Sv, 129/Sv GRKO (3 à 4 souris par point) à différents jours suivant l'inoculation orale de spores fraîches d'*E. intestinalis*. Les souris 129/Sv, 129/Sv GRKO non infectées servent de témoins (jour 0). Ces données sont représentatives de 3 expériences indépendantes ayant donné des résultats similaires.

Nous avons ainsi observé que l'infection orale avec *E. intestinalis* induit une augmentation significative du nombre de LIEs, aussi bien chez les souris 129/Sv que chez les souris 129/Sv GRKO (Figure 13). Chez les animaux sauvages, le nombre de LIEs augmente de façon transitoire entre le jour 7 et le jour 15 p.i., avec un pic observé 9 et 12 jours après l'infection. Chez les souris 129/Sv GRKO, le nombre de LIEs augmente également à partir du 7<sup>ème</sup> jour suivant l'infection ; néanmoins, le nombre de LIEs isolés à partir des souris 129/Sv GRKO infectées demeure ensuite supérieur au nombre de LIEs isolés à partir des souris témoins jusqu'à la fin de l'expérience, contrairement à ce qui est observé chez les souris 129/Sv. Ce résultat s'explique probablement par le caractère chronique de l'infection chez les

souris 129/Sv GRKO, mais aussi par la charge parasitaire plus importante observée, entre autre au niveau intestinal, chez ces animaux par rapport aux souris sauvages (voir Figure 11).

Chez les souris témoins non infectées, la composition phénotypique des LIEs est la suivante :  $38,3\% \pm 1,4$  TCR $\alpha\beta^+$ ,  $26,5\% \pm 1,2$  CD8 $\alpha\beta^+$ ,  $14,7\% \pm 0,9$  CD4 $^+$  pour les animaux 129/Sv ; et  $41,07\% \pm 0,8$  TCR $\alpha\beta^+$ ,  $29,6\% \pm 0,9$  CD8 $\alpha\beta^+$ ,  $15,8\% \pm 0,9$  CD4 $^+$  pour les animaux 129/Sv GRKO. Comme illustré dans la Figure 14, l'infection orale avec *E. intestinalis* induit chez les souris sauvages une augmentation de toutes les sous-populations de LIEs étudiées entre le jour 7 et le jour 15 p.i. Les pourcentages de LIEs CD8 $\alpha\beta^+$  ou CD4 $^+$  atteignent leur maximum respectivement au 12<sup>ème</sup> jour ( $34,1\% \pm 1,4$ ) et au 9<sup>ème</sup> jour ( $21,2\% \pm 1,2$ ) suivant l'inoculation des spores puis retournent à un niveau basal 22 jours après l'infection.

Chez les souris 129/Sv GRKO, l'analyse phénotypique par cytométrie de flux révèle également une augmentation significative des sous-populations de LIEs TCR $\alpha\beta^+$ , CD8 $\alpha\beta^+$  ou CD4 $^+$  à partir du jour 7 p.i. Comme chez les animaux sauvages, les pourcentages de cellules CD8 $\alpha\beta^+$  ou CD4 $^+$  atteignent une valeur maximum, respectivement 12 et 9 jours après l'inoculation des spores ( $49,4\% \pm 1,6$  pour les cellules CD8 $\alpha\beta^+$ ,  $27,2\% \pm 1,3$  pour les cellules CD4 $^+$ ). Par contre, ils persistent ensuite à un niveau élevé jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 14).



**FIGURE 14 : Dynamique des sous-populations de LIEs intestinaux suite à l'infection orale par *E. intestinalis*.** les LIEs sont purifiés à partir des intestins grêles prélevés à différents jours p.i. sur 4 souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO. Les pourcentages relatifs de cellules TCR $\alpha\beta^+$ , CD8 $\alpha\beta^+$  et CD4 $^+$  sont ensuite déterminés par analyse en cytométrie de flux, après un marquage en immunofluorescence directe. Chaque point représente le pourcentage moyen de cellules positives  $\pm$  l'écart-type. Les souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO non infectées servent de témoins (jour 0). Ces données sont représentatives de 2 expériences indépendantes ayant donné des résultats similaires.

En résumé, l'infection orale avec *E. intestinalis* induit une expansion significative des LIEs CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> et des LIEs CD4<sup>+</sup>, suggérant un rôle probable de ces cellules dans le contrôle des microsporidioses. Chez les animaux sauvages, cette expansion est transitoire tandis qu'elle persiste chez les souris 129/Sv GRKO, probablement en raison du caractère chronique de l'infection microsporidienne. Il est également intéressant de noter que l'augmentation du nombre de LIEs suite à l'infection par *E. intestinalis* est plus importante chez les souris 129/Sv GRKO que chez les souris 129/Sv.

## **B-2 Activité cytotoxique *in vitro* des lymphocytes intraépithéliaux**

La majorité des LIEs sont des cellules T CD8<sup>+</sup> potentiellement cytotoxiques. L'infection orale avec *E. intestinalis* provoque chez les souris sauvages une augmentation du nombre de LIEs CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> entre le 7<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour suivant l'infection. Afin d'appréhender le rôle de ces cellules dans la réponse immune cellulaire anti-microsporidienne, nous avons testé l'activité cytotoxique des LIEs intestinaux CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, purifiés à partir des souris 129/Sv infectés par le parasite 12 jours auparavant. Les résultats obtenus montrent que les LIEs CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> provenant des animaux infectés sont cytotoxiques vis-à-vis de macrophages péritonéaux parasités avec *E. intestinalis* (Tableau 9). Par contre, ces cellules ne manifestent aucune cytotoxicité à l'encontre de macrophages non infectés. De même, les LIEs CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> purifiés à partir des animaux non infectés n'exercent aucune activité cytotoxique aussi bien vis-à-vis des macrophages infectés que des macrophages non infectés.

Afin de déterminer si l'activité cytotoxique exercée par les LIEs CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> est génétiquement restreinte, nous avons également réalisé des expériences de cytotoxicité *in vitro* en mettant les LIEs CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> purifiés à partir des souris 129/Sv infectées (haplotype H-2<sup>b</sup>) en contact avec des macrophages péritonéaux, provenant soit de souris 129/Sv, soit de

souris BALB/c (haplotype H-2<sup>d</sup>). Comme précédemment, les LIEs des souris 129/Sv infectées exercent une activité cytotoxique sur les macrophages des souris 129/Sv, lorsqu'ils sont infectés avec *E. intestinalis*. Par contre, nous n'avons détecté aucune cytotoxicité lorsque les macrophages utilisés comme cellules cibles proviennent des souris BALB/c. Ces résultats démontrent donc que l'activité cytotoxique des LIEs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> est restreinte génétiquement par le CMH.

**TABLEAU 9 : Activité cytotoxique des LIEs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> purifiés à partir des souris 129/Sv infectées oralement avec *E. intestinalis*.**

Origine des LIEs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (cellules effectrices)	Macrophages péritonéaux (cellules cibles)	% de cytotoxicité
souris 129/Sv infectées (H-2b)	infectés (129/Sv, H-2b)	31,4
	non infectés (129/Sv, H-2b)	0,5
	infectés (BALB/c, H-2d)	0,0
	non infectés (BALB/c, H-2d)	0,0
souris 129/Sv non infectées (H-2b)	infectés (129/Sv, H-2b)	0,1
	non infectés (129/Sv, H-2b)	0,2
	infectés (BALB/c, H-2d)	0,0
	non infectés (BALB/c, H-2d)	0,0

Douze jours après l'inoculation par la voie orale de spores d'*E. intestinalis*, les LIEs sont obtenus à partir des intestins grêles des souris 129/Sv. La population de LIEs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> est ensuite purifiée à l'aide du système Mini MACS (voir Matériels et Méthodes) puis testée pour son activité cytotoxique.

Les expériences de cytotoxicité *in vitro* sont effectuées en utilisant comme cellules cibles des macrophages péritonéaux de souris 129/Sv ou de souris BALB/c, infectés avec *E. intestinalis*, puis marqués au <sup>51</sup>Cr. Les LIEs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> sont mis en contact avec les macrophages pendant 4 h à 37°C en utilisant un ratio effecteur/cible de 100.

Les résultats fournis dans ce tableau sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### **B-3 Analyse de l'expression duodénale des ARNm spécifiques de cytokines et des chimiokines**

Les cytokines et les chimiokines jouent un rôle crucial dans l'induction et le contrôle de la réponse immunitaire. De nombreux travaux ont permis de montrer que l'immunité protectrice vis-à-vis des microsporidies dépend des cytokines de type Th1 et plus particulièrement de l'IFN- $\gamma$ . Pour compléter nos données concernant la réponse immune cellulaire mise en place au niveau de la muqueuse intestinale suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*, nous avons donc analysé par PCR en temps réel la cinétique d'expression des ARNm spécifiques de diverses cytokines et chimiokines, au niveau du duodénum (site privilégié de multiplication du parasite), chez les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO.

L'ensemble des résultats obtenus sont rapportés dans l'article "*Role of gamma interferon in cytokine and chemokine expression in the duodenum of mice after oral infection with the microsporidium Encephalitozoon intestinalis*" (voir page 111).

Dans cette étude, nous montrons que l'infection orale avec *E. intestinalis* induit au niveau de la muqueuse intestinale des souris sauvages 129/Sv, une sur-expression des ARNm spécifiques des cytokines IFN- $\gamma$ , IL-12p40 et TNF- $\alpha$ , et de l'ARNm de l'enzyme iNOS. Ces animaux développent donc une réponse cytokine de type Th1, efficace pour l'élimination des parasites intracellulaires. Par ailleurs, nous avons également observé chez ces animaux une augmentation de l'expression duodénale des ARNm spécifiques des chimiokines IP-10, MIG, i-TAC, MCP-1, MIP-1 $\beta$  et RANTES suite à l'infection. Toutes ces chimiokines sont connues pour être impliquées dans le recrutement sélectif et l'activation des macrophages et/ou des lymphocytes T (plus particulièrement des lymphocytes T de type Th1).

Des tests *in vitro* nous ont permis de montrer que l'infection des entérocytes de la lignée Mode-K par *E. intestinalis*, tout comme le traitement de ces cellules par l'IFN- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$ ,

induit la sécrétion des diverses chimiokines étudiées *in vivo*. Ces observations indiquent que les entérocytes constituent probablement l'une des premières sources des chimiokines produites au niveau intestinal, suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.

Dans cet article, nous rapportons également qu'en l'absence du récepteur à l'IFN- $\gamma$  (souris 129/Sv GRKO), les ARNm spécifiques de l'IL-12p40, du TNF- $\alpha$  et de l'enzyme iNOS ne sont pas ou peu sur-exprimés suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*. A l'inverse, l'expression des ARNm des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) est plus précoce et/ou plus importante chez les animaux 129/Sv GRKO infectés. Ces derniers semblent donc développer une réponse cytokine à dominante Th2, non efficace pour l'éradication du parasite. De plus, l'analyse de la réponse chimiokine au cours de l'infection chez les souris 129/Sv GRKO révèle 1) l'absence de sur-expression des ARNm de l'IP-10, de MIG et d'i-TAC ; 2) une sur-expression réduite des ARNm spécifiques de MCP-1, MIP-1 $\beta$  et RANTES ; et 3) une augmentation plus importante de l'expression des ARNm spécifiques de MIP-2 et de KC. L'ensemble de ces résultats suggère que le recrutement des macrophages et des lymphocytes T effecteurs au niveau de la muqueuse intestinale est altérée chez les souris 129/Sv GRKO, pouvant ainsi expliquer en partie leur susceptibilité plus importante suite à l'infection par *E. intestinalis*.

**Role of gamma interferon in cytokine and chemokine expression  
in the duodenum of mice after oral infection with  
the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis***

soumis pour publication



**Role of gamma interferon in cytokine and chemokine expression  
in the duodenum of mice after oral infection with  
the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis***

Nicolas Bouladoux, Sylvie Briquet, Dominique Mazier and Isabelle Desportes-Livage

Inserm U511, Immunobiologie Cellulaire et Moléculaire des Infections Parasitaires,  
CHU Pitié-Salpêtrière, 75643 Paris Cedex 13

**Correspondance** : Dr Isabelle Desportes-Livage, Inserm U511, CHU Pitié-Salpêtrière, 91  
boulevard de l'hôpital, 75643 Paris Cedex 13, France. Phone : (+33) 1 40 77 81 05. Fax :  
(+33) 1 45 83 88 58. E-mail : [desporte@ext.jussieu.fr](mailto:desporte@ext.jussieu.fr)

## Introduction

Microsporidia are eukaryotic, obligate intracellular parasites that infect a wide diversity of invertebrate and vertebrate hosts (1). These unicellular parasites have emerged as major causative agents of opportunistic infections in immunocompromised humans since the onset of the AIDS pandemic (2). To date, numerous cases of human microsporidiosis have been reported worldwide for human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients, and some cases of microsporidiosis have been also described in HIV-negative immunocompromised individuals (3). The most frequent clinical manifestations caused by these parasites in AIDS patients are diarrhea, nausea, malabsorption and weight loss (4). Two species are responsible for these gastrointestinal symptoms, *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* (5). Both mainly develop in the enterocytes of small intestine, but *E. intestinalis* also infects the macrophages of the *lamina propria* and can readily disseminate to kidney, hepatobiliary tract and gall bladder (6).

The majority of studies concerning immunobiology of microsporidia were performed after intraperitoneal spores inoculation. Protection against these parasites has been largely associated with the cell-mediated immune response (7-9) and the production of Th1-type cytokines, in particular gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) and interleukine (IL)-12 (10). Initially suggested by *in vitro* observations, the key role of IFN- $\gamma$  in protective immunity against microsporidial infections was further demonstrated in *in vivo* studies with antibody depletion and gene knockout mice (11, 12). We recently reported that mice deficient in IFN- $\gamma$  receptor orally infected with *E. intestinalis* develop chronic and disseminate disease and are unable to clear the infection, whereas control parental wild-type mice rapidly eliminated the parasite (13, 14). However, the mechanisms whereby IFN- $\gamma$  intervenes in the clearance of microsporidia are still not well understood. Experiments using inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene knockout mice have shown that IFN- $\gamma$ -induced nitric oxide production does not

appear to be a critical mechanism for control of microsporidial infection (12). Among the other possible mechanisms, IFN- $\gamma$  could induce and modulate either the production of other cytokines that can be toxic for the parasite or the infected cells, or the production of chemoattractants for immune cells.

The natural acquired route of entry of microsporidia into the host is presumed via oral ingestion of spores present in the environment (15). Thus, intestinal epithelial cells are the primary site of microsporidial infection and consequently provide the first line of defense against these enteric parasites. Enterocytes produce an array of cytokines and chemokines in response to different enteric pathogens (16-18) or locally released cytokines (19-21). Chemokines are a group of secreted low molecular weight cytokines that are key mediators of leukocyte activation and chemotaxis (22). These proteins usually contain four cysteine residues and are subdivided into four families on the basis of the arrangement of the first two N-terminal cysteine residues (23). To date, most chemokines belong to the C-C and C-X-C families. The C-C chemokines, such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), attract mainly monocytes, eosinophils and lymphocytes, whereas the C-X-C chemokines, such as macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG), have stimulatory and chemotactic activities on neutrophils or lymphocytes.

In the present study, we investigated for the first time the duodenal immune response in mice following oral infection with *E. intestinalis*. The mRNA expression of several cytokines and chemokines was analyzed by quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) in the duodenum, where the parasites are actively multiplying. In order to determine which IFN- $\gamma$ -dependent components of the immune response could be involved in the clearance of infection, we compared cytokine and chemokine responses in a healing mouse model (wild-type or WT mice) and in a nonhealing mouse model of the same genetic background that was deficient for the IFN- $\gamma$  receptor (GRKO mice). Finally, to better assess the contribution of the

intestinal epithelial cells in the production of chemokines observed *in vivo*, we also measured *in vitro* the chemokine response of these cells to *E. intestinalis* infection and to IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , two cytokines which are produced during intestinal microsporidiosis.

## Materials and Methods

### *Parasites*

A human isolate of *Encephalitozoon intestinalis* was used throughout the study. The parasites were maintained by continuous passage in rabbit kidney (RK13, ATCC CCL37) cells. The RK13 cells were cultivated in RPMI 1640 containing 8% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), and amphotericin B (0.75 µg/ml). Medium and all culture supplies were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Spores of *E. intestinalis* were harvested from the culture medium, centrifuged at 400 g for 5 min to remove all host cell debris and then sedimented by centrifugation at 3000 g for 20 min. After two washes, the parasites were resuspended in sterile phosphate buffer saline (PBS) and immediately used for infection of mice or cultured cells.

### *Mice and infection*

A breeding pair of IFN- $\gamma$  receptor knockout (GRKO) mice on a 129/Sv/Ev background was obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) (24). Animals were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at the animal housing facilities of the *Nouvelle Animalerie Commune, CHU Pitié-Salpêtrière*. 129/Sv/Ev mice from IFFA Credo (L'Arbresle, France) were used as wild-type (WT) controls. Eight- to ten-week old GRKO and WT mice were infected *per os* by intragastric gavage with  $1 \times 10^7$  spores (in 0.25 ml of sterile PBS) after overnight starvation. At days 4, 7, 9, 12, 15 and 22 post infection, GRKO and WT mice were killed and the duodenum was removed, flushed with sterile PBS and flash-frozen in liquid nitrogen prior to extraction of total RNA (see below).

### *Intestinal epithelial cell line culture and infection protocols*

The adherent murine cell line Mode-K, kindly provided by Dr D. Kaiserlian (Inserm U404, Lyon, France), was obtained after immortalization of epithelial cells from the small intestines of young C3H/HeJ mice by retroviral transfer of the SV40 large T-immortalizing gene using a replication-defective MuLV vector (25). Mode-K adherent cells were maintained at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium containing 8% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.75 µg/ml amphotericin B. The cells were detached using a solution of 0.25% trypsin in 0.5 mM EDTA (Invitrogen) when they were at confluence. For infection protocols, Mode-K were cultured in 24-well flat-bottom culture plate. Parasites were added at a 5:1 spores/cell ratio and incubated for 48, 72 or 96 h at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. As controls, cells were incubated with medium alone. Mode-K cells were also incubated for 5 h with recombinant murine IFN-γ or TNF-α (a kind gift from Dr I. Vouldoukis) at a final concentration of 10 ng/ml. Total RNA extraction from control and infected- or treated-Mode-K cells was performed as described below.

### *Detection and quantitation of cytokine, chemokine and iNOS mRNAs by real-time RT-PCR*

*Total RNA extraction and cDNA synthesis.* Total cellular RNA was extracted from frozen pieces of duodenum and Mode-K cells using TRIzol reagent (Invitrogen). Briefly, Mode-K monolayers were directly lysed in TRIzol, whereas frozen tissues were first reduced to powder in a grinder (Powercrown, Bostitch) cooled in liquid nitrogen, and then immediately dispersed in TRIzol reagent by using a tissue homogeniser (Ultra-Turrax). RNA was subsequently extracted from tissue or cell lysates according to the manufacturer's instructions. Contaminating genomic DNA was removed by hydrolysis with DNase I using the RNase-free DNase Set (Qiagen, Courtaboeuf, France) as recommended by the manufacturer. DNase I was then eliminated by using the 'clean-up' procedure of the QIAamp RNA Blood kit (Qiagen).

First-strand cDNA synthesis was then performed on 5 µg of DNase I-treated total RNA with oligo(dT) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in a 50 µl final volume, using the ProSTAR First Strand RT-PCR kit (Stratagene, The Netherlands) according to the manufacturer's guidelines. The resulting cDNA were subsequently used as template for real-time PCR.

*Real-time PCR for quantitation of cDNA.* Real-time PCR was carried out with an ABI Prism 7700 Sequence Detection System using the double-strand DNA-specific fluorescent dye SYBR Green I (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). The primer pairs used (Table 1) were either previously described (26) or designed with the Primer Express software (Applied Biosystem), such that each primer binds to separate exons to avoid false positive results arising from amplification of contaminating genomic DNA. For each cDNA sample, parallel real-time PCR reactions for the detection of the different studied target genes were performed in duplicate in a 25 µl final volume containing : 12.5 µl of 2× SYBR Green PCR master mix, 500 nM of forward and reverse primers (Invitrogen), and an amount of cDNA equivalent to 200 ng of total RNA. PCR amplification of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also performed for each sample in order to normalize the loading between samples. For all reactions, the amplification conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 90°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Both water and genomic DNA controls were included in each run to ensure specificity.

Relative quantitation of cDNA was done using the comparative  $C_T$  method. Briefly, the  $C_T$  values for the target amplicon and for the endogenous control GAPDH were first determined for each sample after real-time PCR. Differences in the  $C_T$  for the target and the  $C_T$  for the GAPDH, called  $\Delta C_T$ , were calculated to normalize for the differences in the amounts of cDNA added to each real-time PCR reaction. Then, the  $\Delta C_T$  for each experimental sample was subtracted from the  $\Delta C_T$  of the uninfected mice sample (the reference sample used as a

calibrator) to give the  $\Delta\Delta C_T$  value. Finally, the target cDNA amount, normalized to the internal control GAPDH and expressed relative to that in uninfected mice, was calculated by the equation  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

#### *Measurement of nitrite production in cell cultures*

Nitrite production in the culture supernatants of the cytokine-treated Mode-K cells cultures was assayed by the Griess reaction (27). Briefly, 50  $\mu$ l of the culture supernatants was added to 50  $\mu$ l of 1% sulfanilamide (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in hydrochloric acid 1N. Following a 5 min incubation at room temperature, 100  $\mu$ l of 0.5% naphthylenediamine dihydrochloride (Sigma) in HCl 1N was added to the mixture of supernatant and sulfanilamide. After 10 min at room temperature, the optical density was read with a spectrometer at 570 nm. Nitrite concentration was calculated with reference to a standard curve obtained using concentrations from 2 to 500  $\mu$ M of NaNO<sub>2</sub> (in culture medium).

#### *Statistical analysis*

Results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical differences between groups were analysed using the Student's *t*-test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.



## Results

*Th1 and Th2 cytokine and iNOS mRNA duodenal expression in wild-type and GRKO mice following E. intestinalis oral infection.*

The balance between Th1- and Th2-type cytokine response often regulates the outcome of infection with many organisms, in particular intracellular parasites (28). We therefore studied the expression of IFN- $\gamma$ , IL-12p40, IL-18 and iNOS mRNA for the Th1 pattern and IL-4, IL-5 and IL-10 mRNA for the Th2 pattern. The time course of mRNA specific for the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  was also investigated. To analyze cytokine expression at the mucosal level during *E. intestinalis* infection, duodenum was removed from infected wild-type and GRKO mice at various time points and cytokine mRNA levels were evaluated by quantitative real-time RT-PCR after total RNA extraction.

In wild-type mice, both Th1 and Th2 mRNA expression markedly increased in the duodenum following *E. intestinalis* oral infection, except for IL-18, for which the expression levels did not change (Fig. 1). This up-regulation of mRNA expression was observed as early as 4 days p.i. for the Th1-type cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12p40. The mRNA levels of these both cytokines reached a peak at day 9 p.i. and remained more or less elevated, thereafter. These results suggest that IFN- $\gamma$  and IL-12p40 may be among the first cytokines involved in the response to *E. intestinalis*. The TNF- $\alpha$  and iNOS messages were undetectable 4 days after infection; however, at day 7 p.i., our data showed an severalfold increase in the mRNA levels for these molecules (2.7-fold for TNF- $\alpha$  and 4.4-fold for iNOS), which continued up to day 22 after infection (Fig. 1). In contrast with IFN- $\gamma$  and IL-12p40, the overexpression of the Th2-type cytokines IL-4 and IL-10 began only 9 and 12 days after infection, respectively and peaked by day 15 after infection. Finally, WT mice also exhibited a gradual increase in the IL-5 mRNA expression during *E. intestinalis* oral infection.

In GRKO mice, IFN- $\gamma$  transcript was early and strongly up-regulated in the duodenum following infection. As shown in Figure 1, the extent of IFN- $\gamma$  mRNA response observed in infected GRKO animals was similar to or higher than that in infected wild-type mice. In contrast, in the absence of IFN- $\gamma$  receptor, there was no variation of the IL-12p40 mRNA level all along the course of infection, and the TNF- $\alpha$  and iNOS mRNA expression was poorly increased in comparison with wild-type animals (Fig. 1). On the contrary, the three Th2-type cytokines, IL-4, IL-5 and IL-10, were still overexpressed in the duodenum of infected GRKO mice. The up-regulation of IL-4 and IL-10 mRNAs was observed as soon as 4 days p.i in GRKO mice, whereas it occurred later (from 9 or 12 days p.i.) in wild-type mice. In addition, the level of the message specific for IL-5 was greater in the duodenum of GRKO mice than in wild-type mice. All together, these observations showed that GRKO mice exhibited not only an impaired Th1-type cytokine response but also an earlier and increased Th2-type cytokine expression at the duodenal level following *E. intestinalis* oral infection.

*Comparison of the duodenal chemokine responses in E. intestinalis-infected wild-type and GRKO mice.*

We next assessed the kinetics of chemokine mRNA expression in the duodenum of wild-type and GRKO mice following oral infection by *E. intestinalis*. As shown in Figure 2, in wild-type mice, the mRNA levels of the three C-X-C chemokines IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10), monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG), and interferon-inducible T cell  $\alpha$ -chemoattractant (i-TAC), were dramatically increased by day 4 p.i. and remained high up to the end of the study. The strongest up-regulation was measured 7 and 9 days after infection for IP-10 (approximately 26-fold) and i-TAC (approximately 52-fold), respectively, suggesting a role for these chemokines in the mucosal immune response against *E. intestinalis* infection. In contrast, the C-X-C chemokines KC and macrophage inflammatory protein 2

(MIP-2), exhibited only modest overexpression from day 7 after infection. Finally, the mRNA expression of the C-C chemokines monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), MIP-1 $\beta$ , and RANTES were also gradually enhanced during the infection.

In comparison with wild-type mice, the expression of the IP-10, MIG and i-TAC chemokines, which is dependent on IFN- $\gamma$  production, was profoundly impaired in the duodenum of GRKO mice after *E. intestinalis* oral infection (Fig. 2). The i-TAC chemokine showed a very slight increase in mRNA expression at day 12 and 15 p.i. (1.8- and 2-fold, respectively), while no significant overexpression was observed for IP-10 and MIG during the course of infection. Up-regulation of the mRNAs for the C-X-C chemokines KC and MIP-2 was significantly greater in GRKO mice than in wild-type mice. Conversely, the induction of MCP-1, MIP-1 $\beta$  and RANTES gene expression was diminished in GRKO mice, since the mRNA levels detected for these C-C chemokines were always lower than those quantified in wild-type mice (Fig. 2).

*Increased C-C and C-X-C chemokine expression in response to E. intestinalis infection of murine intestinal epithelial cells (Mode-K cells).*

*In vivo*, *E. intestinalis* firstly infects enterocytes of the small intestine mucosa. These cells are known to produce a wide range of cytokines and chemokines in response to different enteric pathogens (16-18). In order to investigate whether *E. intestinalis* infection can induce chemokines production by enterocytes and which chemokines are up-regulated by these infected host cells without environmental cytokines, murine intestinal epithelial cells (Mode-K cells) were infected *in vitro* with *E. intestinalis*. Total RNA was extracted at different times after infection (48, 72 and 96 h p.i.) and expression of chemokine mRNAs was assessed by real-time RT-PCR. Noninfected control Mode-K cells constitutively express message specific for the chemokine MCP-1 and RANTES at moderate levels (data not shown). *E. intestinalis*

infection of murine intestinal epithelial cells resulted in a strong up-regulation of the C-C chemokines MIP-1 $\beta$  and RANTES, and of the C-X-C chemokines IP-10, MIG and i-TAC (Fig. 3). For all these chemokines, the levels of mRNA transcripts increased as early as 48 h p.i., peaked at 72 h p.i. and decreased thereafter. MIP-1 $\beta$  and i-TAC were the most up-regulated chemokines studied (44- and 50-fold at 72 h p.i., respectively). Our data showed that intestinal epithelial cells also expressed a high level of MIP-2 mRNA from 72 h after infection with *E. intestinalis*. In comparison with uninfected cells, MIP-2 mRNA expression was 47- and 41-fold higher in infected Mode-K cells at 72 and 96 h p.i., respectively. In contrast, the chemokines MCP-1 and KC exhibited only modest up-regulation in *E. intestinalis*-infected Mode-K cells at 72 h (4- and 2-fold, respectively) and 96 h after infection (2.5- and 3-fold) as shown in Figure 3.

*Effect of proinflammatory cytokines on chemokine mRNA expression by murine Mode-K cells.*

We have observed that oral infection with *E. intestinalis* spores enhances the expression of the cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the duodenum of WT mice. In GRKO mice, although IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are still overexpressed after infection, the up-regulation of TNF- $\alpha$  mRNA is reduced compared to that observed in WT mice. In order to further understand the role of enterocytes on the proinflammatory response observed *in vivo* after *E. intestinalis* infection, we investigated the effects of these both proinflammatory cytokines on chemokine expression by the murine intestinal epithelial cell line. As shown in Figure 4, Mode-K cells overexpressed MIG and i-TAC mRNAs only after IFN- $\gamma$  stimulation, whereas the IP-10 mRNA level increased after IFN- $\gamma$  treatment and to a lesser extent after TNF- $\alpha$  treatment. TNF- $\alpha$  also enhanced the levels of mRNAs of the C-X-C chemokines KC and MIP-2 expressed by cell line Mode-K. Although TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  both induced up-regulation of the C-C chemokines MCP-1 and RANTES, it should be noted that the cytokine TNF- $\alpha$  allowed a

strongest overexpression of mRNAs specific for these chemokines by the murine intestinal epithelial cells than IFN- $\gamma$ . Finally, production of the C-C chemokine MIP-1 $\beta$  transcripts increased in Mode-K cells after TNF- $\alpha$  treatment, but was not influenced by stimulation with IFN- $\gamma$  (Fig. 4).

*Proinflammatory cytokines induce nitrite production and iNOS mRNA expression in cultured mouse Mode-K enterocytes.*

The cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are well-known potent inducers of NO synthesis by the activating iNOS. The microbicidal activity of NO against intracellular parasites is well documented (29). We therefore examined whether IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$  treatment stimulates the release of nitrite by the murine enterocyte cell line Mode-K. As shown in Figure 5 (panel A), Mode-K cells markedly produced high levels of nitrite after treatment with IFN- $\gamma$  and to a lesser extent following treatment with TNF- $\alpha$ , whereas nitrites are not detected in culture supernatant of unstimulated control cells. Moreover, nitrite secretion was paralleled by strongly up-regulated expression of mRNA specific for iNOS in activated Mode-K cells as examined by real-time RT-PCR (Fig. 5 panel B). The iNOS overexpression was greater in the case of Mode-K cells treated with IFN- $\gamma$  treatment (9.2-fold increase) than after TNF- $\alpha$  stimulation (2.9-fold increase).

## Discussion

Most of what is known about the immunobiology of microsporidia results from studies realized with mice artificially infected by intraperitoneal inoculation of spores. In this study, we reported for the first time data concerning the mucosal immune response in mice following infection by oral ingestion of spores, which constitutes the presumed natural acquired route of entry of these parasites into the host. The key role of IFN- $\gamma$  in resistance to microsporidia was clearly demonstrated by numerous studies (12, 13). We previously observed that IFN- $\gamma$  receptor knockout (GRKO) mice display higher susceptibility to oral infection with *E. intestinalis* than wild-type mice (13). GRKO mice challenged with *E. intestinalis* develop chronic and disseminate disease whereas parental wild-type animals are able to clear the infection in 2 weeks (13, 14). Protective immunity against microsporidia is therefore dependent on the presence of IFN- $\gamma$ , but the way in which this cytokine has its protective effect still needs to be clarified.

In the present study, we first investigated the effect of IFN- $\gamma$  on other cytokines that could play a role in the resolution of murine microsporidiosis using 129/Sv/Ev wild-type and GRKO mice. *E. intestinalis* oral infection of wild-type mice induces strong up-regulation of IFN- $\gamma$ , IL-12p40 and iNOS mRNA expression in the mucosa, whereas mRNA expression of IL-12p40 and iNOS was not increased or poorly increased in GRKO mice. It should be also noted that IFN- $\gamma$  mRNA was still overexpressed in the duodenum of infected GRKO mice and that the levels of IFN- $\gamma$  mRNA was clearly higher in these animals than in wild-type mice. However, the absence of functional IFN- $\gamma$  receptor prevents any influence of this cytokine upon the immune response against *E. intestinalis*. IL-12 and iNOS have been shown to participate in the clearance of infection. Khan et al. reported that the treatment of mice with neutralizing antibody against IL-12 before experimental intraperitoneal inoculation of *E. cuniculi* spores resulted in enhanced mortality for these animals (12). Moreover, mice

lacking the IL-12 gene succumbed to infection upon intraperitoneal challenge with *E. cuniculi* (12). Our results show that the up-regulation of IFN- $\gamma$  mRNA expression preceded the maximum level of mRNA specific for IL-12p40 and that IFN- $\gamma$  was strongly overexpressed in GRKO mice while IL-12p40 mRNA was never up-regulated. Taken together, these findings suggest that IL-12 may not be the only cytokine implicated in the initial increase in IFN- $\gamma$  mRNA expression in the duodenum. IL-18 is known to be another strong inducer of IFN- $\gamma$  and also to be expressed in mouse intestinal epithelial cells (30). However, although transcripts were detected by RT-PCR, we did not observe any increase of the IL-18 mRNA expression level during the infection. Nevertheless, a role of IL-18 in the initial IFN- $\gamma$  response after *E. intestinalis* oral infection is not totally excluded, since to release the IL-18 mature form pro-IL-18 needs to be cleaved by a protease (31). The important role of IFN- $\gamma$  in the protection against microsporidia is believed to be primarily dependent on the cytokine's ability to activate macrophages to release nitric oxide. IFN- $\gamma$ -activated murine peritoneal macrophages can inhibit *in vitro* the replication of *E. cuniculi* (11). This was reported by the studies which demonstrated that inhibition of nitric oxide synthesis prevented blockage of parasite growth. Here, we reported that *in vitro* stimulation with IFN- $\gamma$  induced expression of iNOS mRNA and nitrite production by intestinal epithelial cell line Mode-K, whereas *E. intestinalis* infection alone did not (unpublished data). Our data also show an increased expression of iNOS in the duodenum following oral infection of wild-type mice. Moreover, our results extend those findings by demonstrating that IFN- $\gamma$  is most probably responsible for the majority of iNOS mRNA overexpression after infection. In fact, in the absence of IFN- $\gamma$  receptor, the up-regulation of iNOS mRNA levels was strongly reduced compared to wild-type mice. All together, these observations emphasize a role for nitric oxide in the protective immunity against microsporidia. However, we have observed no difference in the susceptibility to oral *E. intestinalis* oral infection between wild-type and iNOS knockout mice

(unpublished data). These observations support earlier findings that mice lacking the iNOS gene could withstand very high infective dose of *E. cuniculi* (12). Therefore, nitric oxide-induced killing of microsporidia does not appear to be the critical mechanism by which IFN- $\gamma$  exerts its key role in protection against microsporidiosis.

In both wild-type and GRKO mice, mRNA expression levels for the Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-10 increased in the mucosa during infection. However, in IFN- $\gamma$  receptor deficient mice, *E. intestinalis* oral infection resulted in a shift to a higher level of IL-5 mRNA expression and an earlier up-regulation of IL-4 and IL-10 expression. In accordance with these results, members of our laboratory have previously observed using immunohistochemistry, a modest but significant increase in the number of cells secreting IL-4 and IL-10 in the duodenal mucosa of GRKO mice during the infection, whereas no variation was detected in wild-type mice (32). The role of these Th2 cytokines in the resolution of *E. intestinalis* infection deserves to be further investigated. IL-10 has been reported to be involved in the regulation of the Th1 immune response in other infectious disease models and therefore may play a similar role in microsporidial infection (33, 34). Both IL-4 and IL-5 are cytokines that enhance the growth and differentiation of B cells leading to the production of antibodies. Specific antibodies to microsporidia probably play a role in resistance, but they alone do not protect the host from disease (10). Finally, the production of IL-4, IL-5 and IL-10 in the duodenum during the infection of GRKO mice did not prevent the chronic infection, confirming that the Th1 cytokine response is indispensable for the clearance of microsporidia.

Chemokines are a large family of secreted proteins involved in regulating multiple steps in host defense mechanisms (22). These molecules are critical for the activation and recruitment of effector immune cells at sites of infection. Furthermore, they also participate in cell-mediated immunity and can stimulate cytokine production associated with Th1-Th2 polarization, which is of greatest importance in the control of infection by intracellular



parasites (35). Chemokines can be released by many different cell types in the duodenal mucosa, in particular enterocytes. Previous studies have shown that enterocytes produce an array of chemokines in response to infection with different parasites (17, 38). In this present study, experiments performed with the murine intestinal epithelial cell line Mode-K demonstrated that *E. intestinalis* infection induces strong overexpression of the C-C chemokine MIP-1 $\beta$  and RANTES mRNAs and the C-X-C chemokine IP-10, MIG and i-TAC mRNAs by enterocytes. These results clearly suggest that enterocytes are a primary source of chemokines in the host response to *E. intestinalis*.

We also assessed the duodenal chemokine response during murine microsporidiosis. In wild-type mice, *E. intestinalis* oral infection resulted in rapid strong overexpression of the mRNAs of IFN- $\gamma$ -inducible chemokines (IP-10, MIG, i-TAC) in the duodenum. Our data also showed a gradual increase in the duodenal expression of MCP-1, MIP-1 $\beta$  and RANTES during the infection. All these chemokines are probably produced initially by the enterocytes in response to infection by the parasite. Moreover, expression of the chemokines IP-10, i-TAC and MIG was correlated with the up-regulation of IFN- $\gamma$  mRNA levels in the infected duodenum of wild-type mice, and we observed that IFN- $\gamma$  stimulated the *in vitro* production of IP-10, MIG and i-TAC by the intestinal epithelial cell line Mode-K. Therefore, we hypothesized that the increased expression of IP-10, i-TAC and MIG mRNAs could be partially due to the stimulation of intestinal epithelial cells by the presence of IFN- $\gamma$  in the infected duodenal mucosa. These chemokines are chemotactic for the macrophages. Following stimulation with IFN- $\gamma$ , these cells may also be an important source of IP-10, i-TAC and MIG released in the duodenal mucosa. In the same way, the kinetics of MCP-1, MIP-1 $\beta$  and RANTES production could be related to the up-regulation of TNF- $\alpha$  mRNA level during the infection. In fact, TNF- $\alpha$  induced the overexpression of RANTES, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  by Mode-K cells. These C-C chemokines have chemotactic activities on T cells

and macrophages. Once present in the infected duodenal mucosa, these cells may amplify the chemokine response by releasing in turn MCP-1, MIP-1 $\beta$  and RANTES.

Immune cytokines, in particular IFN- $\gamma$ , are important modulators of chemokine production. In this study, we explored the importance of IFN- $\gamma$  in the regulation of the duodenal chemokine response during murine microsporidiosis. For this purpose, we compared the duodenal chemokine mRNA expression in GRKO and wild-type animals following *E. intestinalis* oral expression. We found that following infection, the specific chemoattractants for neutrophils KC and MIP-2 were overexpressed more in the duodenum of GRKO mice than in the duodenum of wild-type mice. Moreover, in contrast with wild-type mice, no overexpression of the three IFN- $\gamma$ -inducible chemokines IP-10, i-TAC and MIG was observed in infected GRKO animals, and the C-C chemokines MCP-1, MIP-1 $\beta$  and RANTES exhibited only a weak up-regulation of their mRNA levels during the infection. All these molecules are associated with the recruitment of macrophages and activated T cells. Similar patterns of chemokine expression have been reported in IFN- $\gamma$  knockout mice during *Cryptosporidium parvum* (37), *Toxoplasma gondii* (38) or *Trypanosoma cruzi* (39) infection. In these disease models, infected IFN- $\gamma$  knockout mice displayed diminished or impaired recruitment of T lymphocytes at the sites of infection in comparison with the recruitment of T cells in wild-type mice (37, 39). Therefore, we hypothesize that the recruitment of T cells to sites of infection was probably altered in GRKO mice during the infection. Several studies have highlighted the importance of T lymphocytes in the development of a protective immune response to microsporidia (8-10). All together, these observations suggested that the recruitment of T cells in the infected tissue and consequently the chemokines that attract these cells must be crucial for protective immunity against microsporidiosis. Further investigations will focused on the characterization of the immune cells present in the duodenal mucosa during *E. intestinalis* infection.

In conclusion, our results indicate that resolution of *E. intestinalis* oral infection is dependent on the duodenal expression of IFN- $\gamma$ . In fact, infected wild-type mice exhibited Th1 and Th2 cytokine mRNA expression in the duodenum, whereas the chronic and disseminated infection in GRKO mice was associated with a dramatically impaired Th1 cytokine mRNA expression and an earlier Th2-type immune response. In this study, we reported that IFN- $\gamma$  facilitates the up-regulation of IL-12p40, iNOS and TNF- $\alpha$  mRNA expression in the duodenum after *E. intestinalis* oral infection. IL-12 and nitric oxide have been shown to participate in the protection of mice against microsporidiosis. Another mechanism by which IFN- $\gamma$  could protect against microsporidiosis is by recruitment of effector T cells and macrophages to sites of infection via the production of IP-10, MIG and i-TAC C-X-C chemokines and MCP-1, MIP-1 $\beta$  and RANTES C-C chemokines. The precise role of these chemokines in the outcome of murine microsporidiosis in wild-type mice remains to be determined.

## **Acknowledgements**

We are indebted to Isabelle Raymond (*Nouvelle Animalerie Commune, CHU Pitié-Salpêtrière*) for breeding and maintenance of the GRKO mice, and to Maurel Tefit for animal care and technical assistance. We are grateful to Dr Dominique Kaiserlian (Inserm U404, Lyon, France) for providing Mode-K cells, to Dr Ioannis Vouldoukis (Inserm U511) for the kind gift of murine IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and to Dr Monique Lafon (Institut Pasteur, Paris, France) for the use of Taqman and FACS facilities. We also thank Dr M. Lafon and his staff for valuable suggestions, helpful discussions and encouragements during the preparation of these studies. Finally, we gratefully acknowledge Dr Catherine Vaquero for her critical review of this manuscript.

N. Bouladoux is supported by a fellowship from Sidaction.

## References

1. Desportes-Livage, I. 2000. Biology of microsporidia. In *Cryptosporidiosis and microsporidiosis*, Vol. 6. F. Petry, ed. Karger, Basel, p. 140.
2. Bryan, R. T., and D. A. Schwartz. 1999. Epidemiology of microsporidiosis. In *The microsporidia and microsporidiosis*. M. Wittner, and L. M. Weiss, eds. ASM Press, Washington D. C., p. 502.
3. Desportes-Livage, I., and E. Bylén. 1998. Microsporidiosis infection in HIV-negative subjects. *Acta Protozoologica* 37:63.
4. Kotler, D. P., and J. M. Orenstein. 1998. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv Parasitol* 40:321.
5. Coyle, C. M., M. Wittner, D. P. Kotler, C. Noyer, J. M. Orenstein, H. B. Tanowitz, and L. M. Weiss. 1996. Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clin Infect Dis* 23:1002.
6. Orenstein, J. M., H. P. Gaetz, A. T. Yachnis, S. S. Frankel, R. B. Mertens, and E. S. Didier. 1997. Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared ? *AIDS* 11:385.
7. Schmidt, E. C., and J. A. Shadduck. 1984. Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J Immunol* 133:2712.
8. Hermanek, J., B. Koudela, Z. Kucerova, O. Ditrich, and J. Travnicek. 1993. Prophylactic and therapeutic immune reconstitution of SCID mice infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 40:287.

9. Khan, I. A., J. D. Schwartzman, L. H. Kasper, and M. Moretto. 1999. CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 162:6086.
10. Khan, I. A., M. Moretto, and L. M. Weiss. 2001. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect* 3:401.
11. Didier, E. S. 1995. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol* 17:405.
12. Khan, I. A., and M. Moretto. 1999. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 67:1887.
13. Achbarou, A., C. Ombrouck, T. Gneragbe, F. Charlotte, L. Renia, I. Desportes-Livage, and D. Mazier. 1996. Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasite Immunol* 18:387.
14. El Fakhry, Y., A. Achbarou, J. F. Franetich, I. Desportes-Livage, and D. Mazier. 2001. Dissemination of *Encephalitozoon intestinalis*, a causative agent of human microsporidiosis, in IFN-gamma receptor knockout mice. *Parasite Immunol* 23:19.
15. Franzen, C., and A. Müller. 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 12:243.
16. Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95:55.
17. Laurent, F., L. Eckmann, T. C. Savidge, G. Morgan, C. Theodos, M. Naciri, and M. F. Kagnoff. 1997. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect Immun* 65:5067.

18. Casola, A., M. K. Estes, S. E. Crawford, P. L. Ogra, P. B. Ernst, R. P. Garofalo, and S. E. Crowe. 1998. Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. *Gastroenterology* 114:947.
19. Panja, A., S. Goldberg, L. Eckmann, P. Krishen, and L. Mayer. 1998. The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 161:3675.
20. Song, F., K. Ito, T. L. Denning, D. Kuninger, J. Papaconstantinou, W. Gourley, G. Klimpel, E. Balish, J. Hokanson, and P. B. Ernst. 1999. Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines. *J Immunol* 162:2275.
21. Dwinell, M. B., N. Lugerling, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff. 2001. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120:49.
22. Mackay, C. R. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2:95.
23. Rossi, D., and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217.
24. Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1993. Immune response in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor. *Science* 259:1742.
25. Vidal, K., I. Grosjean, J. P. evillard, C. Gespach, and D. Kaiserlian. 1993. Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J Immunol Methods* 166:63.
26. Overbergh, L., D. Valckx, M. Waer, and C. Mathieu. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11:305.

27. Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131.
28. Infante-Duarte, C., and T. Kamradt. 1999. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol* 21:317.
29. James, S. L. 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev* 59:533.
30. Takeuchi, M., Y. Nishizaki, O. Sano, T. Ohta, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res* 289:499.
31. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui, and H. Okamura. 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19:423.
32. El Fakhry, Y., A. Achbarou, I. Desportes-Livage, and D. Mazier. 1998. *Encephalitozoon intestinalis*: humoral responses in interferon-gamma receptor knockout mice infected with a microsporidium pathogenic in AIDS patients. *Exp Parasitol* 89:113.
33. Neyer, L. E., G. Grunig, M. Fort, J. S. Remington, D. Rennick, and C. A. Hunter. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65:1675.
34. Trinchieri, G. 1997. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol* 9:17.
35. Brenier-Pinchart, M. P., H. Pelloux, D. Derouich-Guergour, and P. Ambroise-Thomas. 2001. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* 17:292.
36. Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, F. J. Mennechet, V. Martin, A. C. Lepage, J. D. Schwartzman, and L. H. Kasper. 2001. Murine ileitis after intracellular parasite infection



is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120:914.

37. Lacroix-Lamande, S., R. Mancassola, M. Naciri, and F. Laurent. 2002. Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 70:2090.
38. Amichay, D., R. T. Gazzinelli, G. Karupiah, T. R. Moench, A. Sher, and J. M. Farber. 1996. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-g with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 157:4511.
39. Aliberti, J. C., J. T. Souto, A. P. Marino, J. Lannes-Vieira, M. M. Teixeira, J. Farber, R. T. Gazzinelli, and J. S. Silva. 2001. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 158:1433.

## Figures legends

**Table 1.** Sequences of oligonucleotide primers for real-time PCR.

**Figure 1.** Kinetics of cytokine and iNOS gene expression in the duodenum of wild-type and GRKO mice after *E. intestinalis* oral infection. Total RNA was extracted from the duodenum of infected wild-type and GRKO animals removed at different days p.i., and cytokine and iNOS mRNA levels were assayed by quantitative real-time RT-PCR. Gene expression in the challenged animals was normalized to GAPDH, and then reported as the n-fold increase over the GAPDH-normalized expression in the duodenum of uninfected control mice (day 0). For each time point, data represent the arithmetic mean  $\pm$  standard deviation of results from three mice (some error bars are too small to be seen). Stars (\*) represent the significant difference in gene expression between GRKO and wild-type mice, as determined by Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ). Data are representative of two independent experiments with similar results.

**Figure 2.** Time course of chemokine gene expression in the duodenum of wild-type and GRKO mice following oral infection with *E. intestinalis*. Duodenal levels of various chemokine mRNAs were assayed using quantitative real-time RT-PCR at different days p.i. in wild-type and GRKO mice. The data are expressed as indicated in the legend of Figure 1 and are representative of two independent experiments with similar results.

**Figure 3.** Chemokine mRNA expression by the enterocytes cell line Mode-K following *E. intestinalis* infection. Confluent monolayers of Mode-K cells grown in 24-well plates were infected with *E. intestinalis* at a ratio of five spores per cell. Control cells were cultured in parallel with medium alone. At various times postinfection (48, 72 and 96 h), chemokine mRNA levels were determined by quantitative real-time RT-PCR. Expression of various

chemokine genes in the infected cells was normalized to GAPDH and then reported as the n-fold increase over the GAPDH-normalized expression for the specific chemokine in the uninfected control cells. Data points from infected and control cultures are means  $\pm$  standard deviations of triplicate cultures from a single representative experiment. Similar results were obtained in two additional experiments.

**Figure 4.** Chemokine mRNA expression by Mode-K cells treated with IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ . Confluent monolayers of Mode-K cells on 24-well plates were incubated with murine IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) or murine TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) for 5 h. Control cells were cultured in parallel with medium alone. After treatment, mRNA levels of various chemokines were assessed by quantitative real-time RT-PCR. Chemokine gene expression in the IFN- $\gamma$ - or TNF- $\alpha$ -treated cells was normalized to GAPDH and then reported as the n-fold increase over the GAPDH-normalized expression for the specific chemokine in the untreated control cells. The data is representative of two independent experiments with similar results.

**Figure 5.** Nitrite production (A) and iNOS mRNA expression (B) by Mode-K cells after treatment with murine IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ . (A) Culture supernatants of treated or untreated cells were collected and assayed for nitrite amounts by the Griess reaction. The data represent means  $\pm$  standard deviations of triplicate cultures. Results of one of three similar experiments are shown. ND, not detected. (B) The levels of iNOS mRNA in IFN- $\gamma$ - or TNF- $\alpha$  treated Mode-K cells were measured using quantitative real-time RT-PCR. The GAPDH-normalized expression of iNOS gene in treated cells was reported as the n-fold increase over the GAPDH-normalized iNOS expression in the untreated control cells. The data is representative of 3 independent experiments with similar results.

Table 1

Target mRNA	Sens Primer	Anti-sens primer
<i>Cytokines</i>		
IFN- $\gamma$	5'-AGCTCTGAGACAATGAACGC-3'	5'-GGACAATCTCTTCCCCACCC-3'
TNF- $\alpha$	5'-CTGAACTTCGGGGTGATCGG-3'	5'-GTATGAGATAGCAAATCGGC-3'
IL-12p40	5'-GGAAGCACGGCAGCAGAATA-3'	5'-AACTTGAGGGGAGAAGTAGGAATGG-3'
IL-18	5'-ACTGTACAACCGCAGTAATACGG-3'	5'-AGTGAACATTACAGATTTATCCC-3'
IL-4	5'-ACAGGAGAAGGGACGCCAT-3'	5'-GAAGCCCTACAGACGAGCTCA-3'
IL-5	5'-AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT-3'	5'-TCCAATGCATAGCTGGTGATTT-3'
IL-10	5'-GCCTTATCGGAAATGATCCA-3'	5'-TTTTCACAGGGGAGAAATCG-3'
iNOS	5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'	5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3'
<i>C-C chemokines</i>		
MCP-1	5'-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'	5'-GTGCTGAAGACCTTAGGGCA-3'
MIP-1 $\beta$	5'-GCTCTGTGCAAACCTAACCC-3'	5'-AAGAAGAGGGGCAGGAAATC-3'
RANTES	5'-CCCTCACCATCATCCTCACT-3'	5'-ATTTCTTGGGTTTGCTGTGC-3'
<i>C-X-C chemokines</i>		
IP-10	5'-CCTATCCTGCCACGTGTTGAG-3'	5'-CGCACCTCCACATAGCTTACAG-3'
MIG	5'-GATCAAACCTGCCTAGATCC-3'	5'-GGCTGTGTAGAACACAGAGT-3'
i-TAC	5'-CCATAGCCCTGGCTGCGATC-3'	5'-CCAAGACAGCAGAGGGTCCG-3'
KC	5'-GACGAGACCAGGAGAAACAGGG-3'	5'-AACGGAGAAAGAAGACAGACTGCT-3'
MIP-2	5'-TCCAGAGCTTGAGTGTGACG-3'	5'-GCCATCCGACTGCATCTATT-3'
GAPDH	5'-ACCACCATGGAGAAGGCTGG-3'	5'-CTCAGTGTAGCCCAGGATGC-3'

Fig. 1

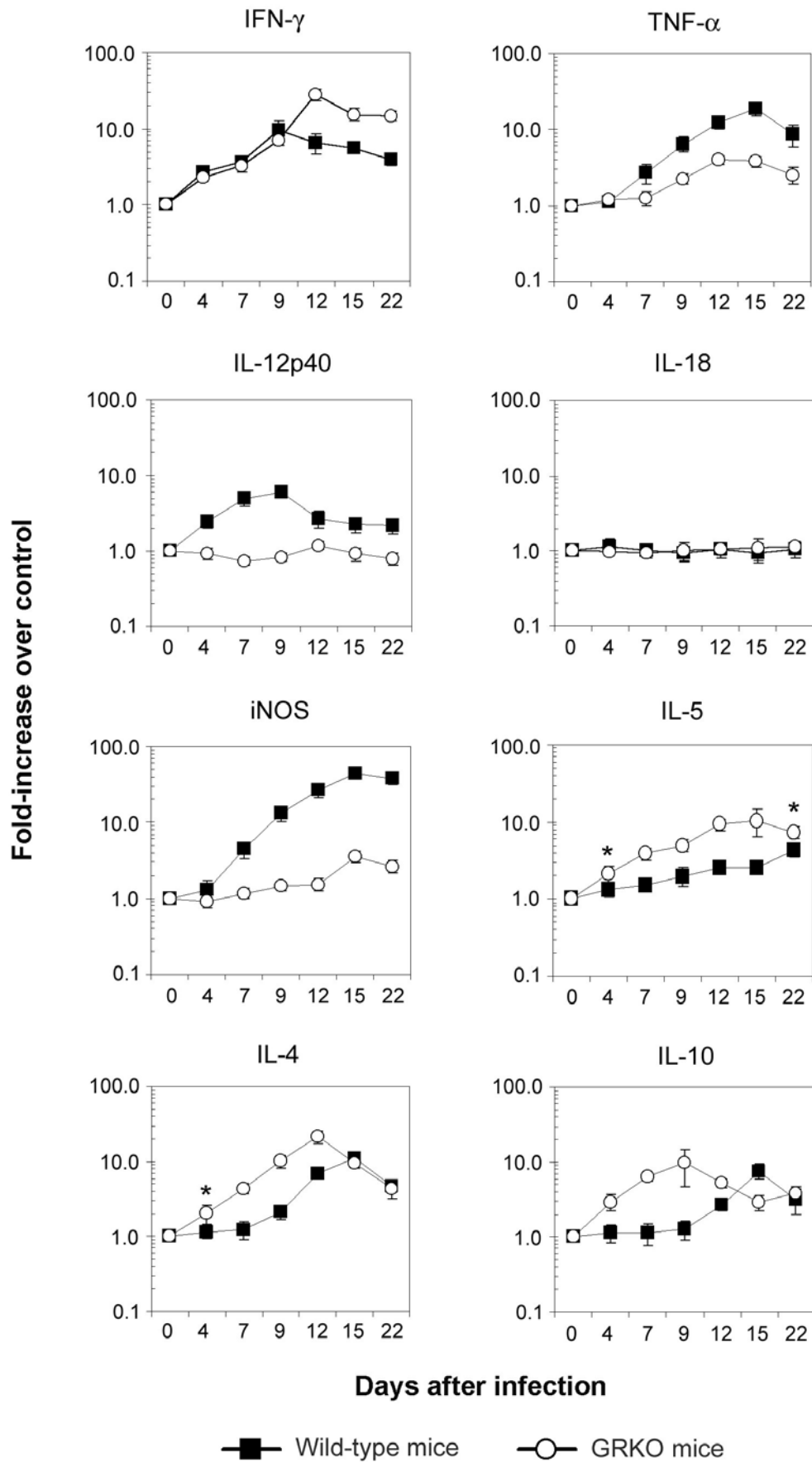


Fig. 2

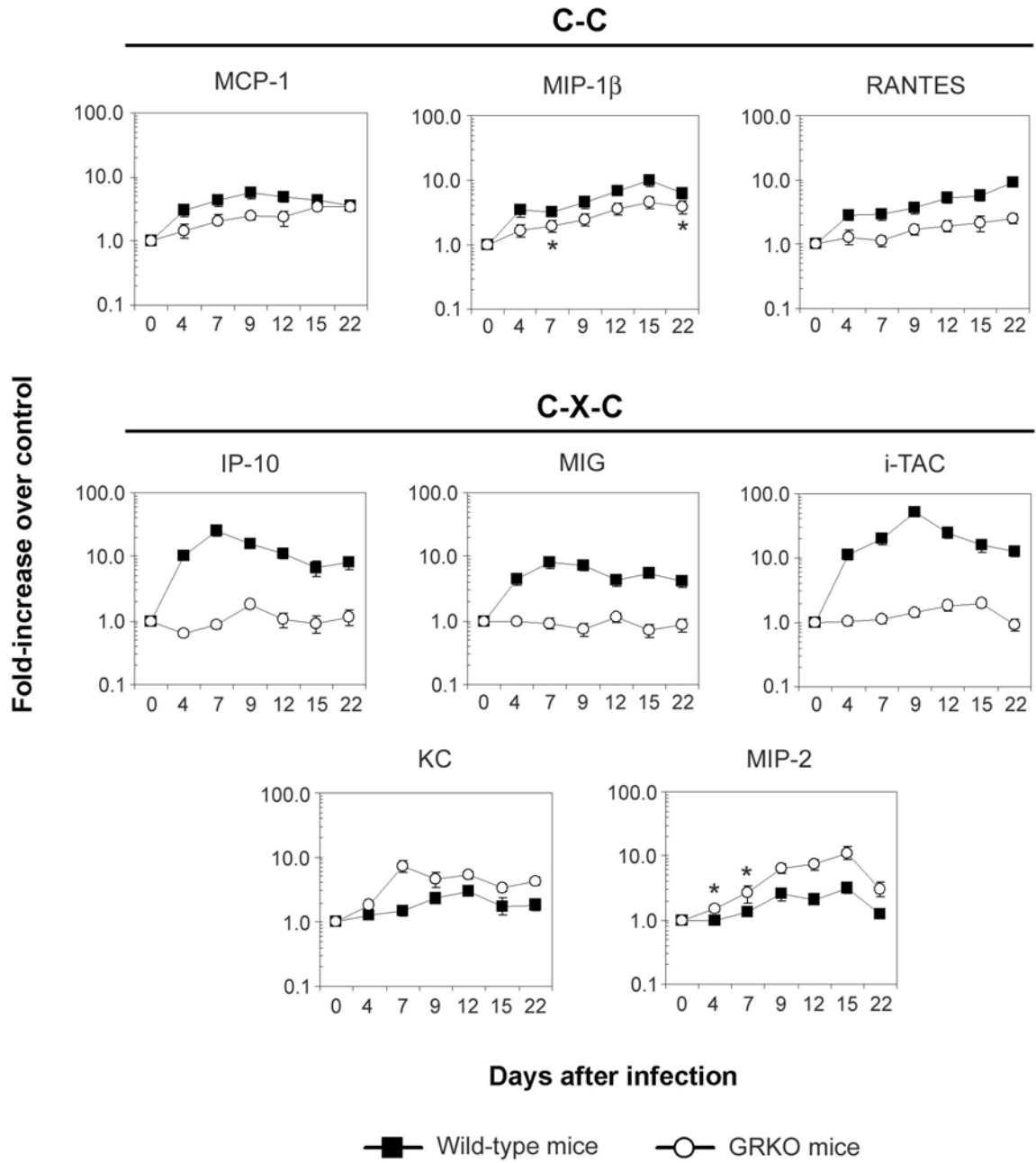


Fig. 3

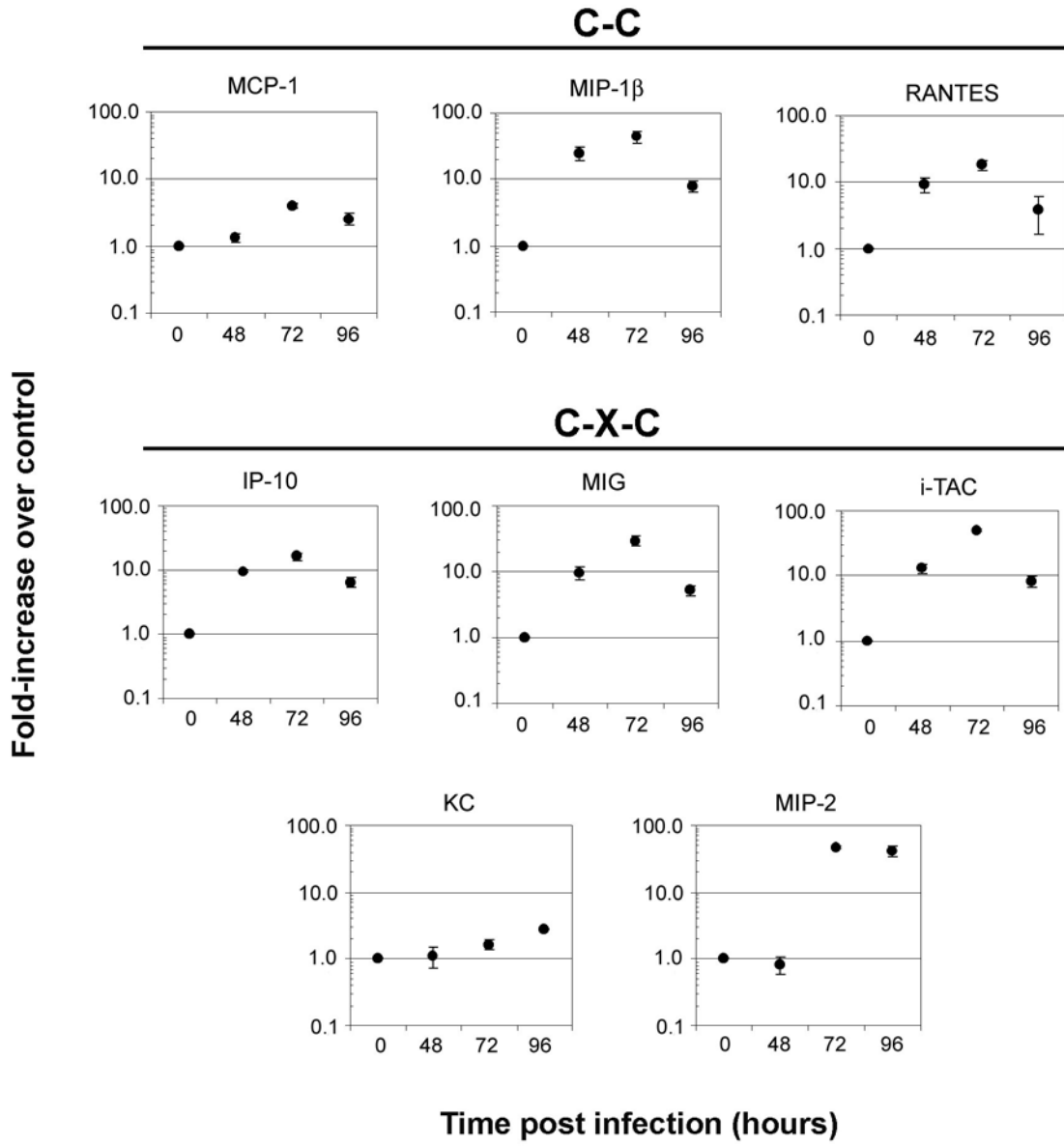


Fig. 4

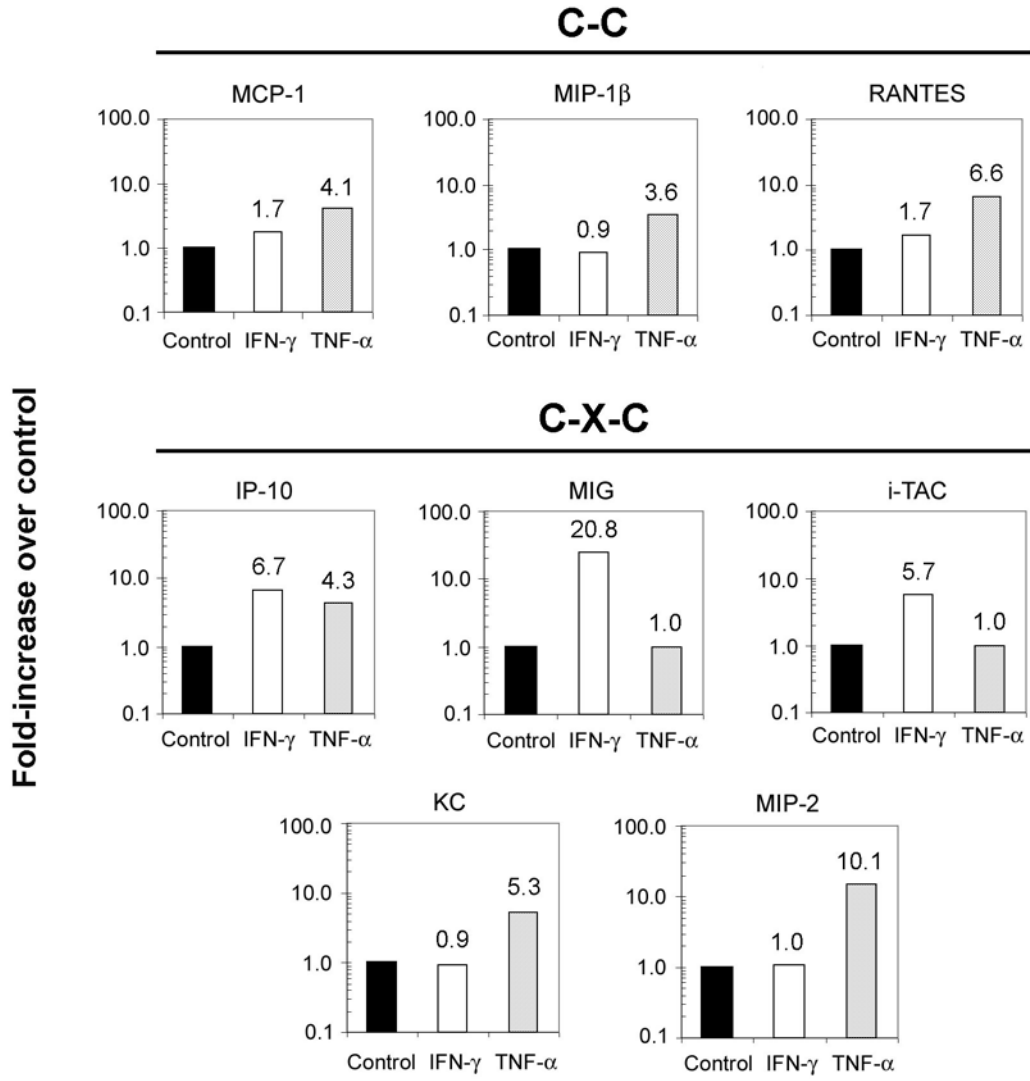
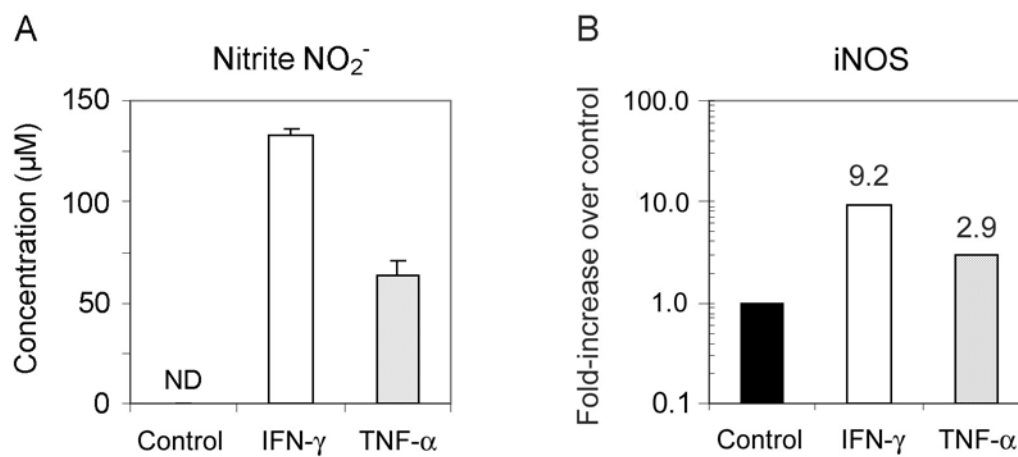




Fig. 5

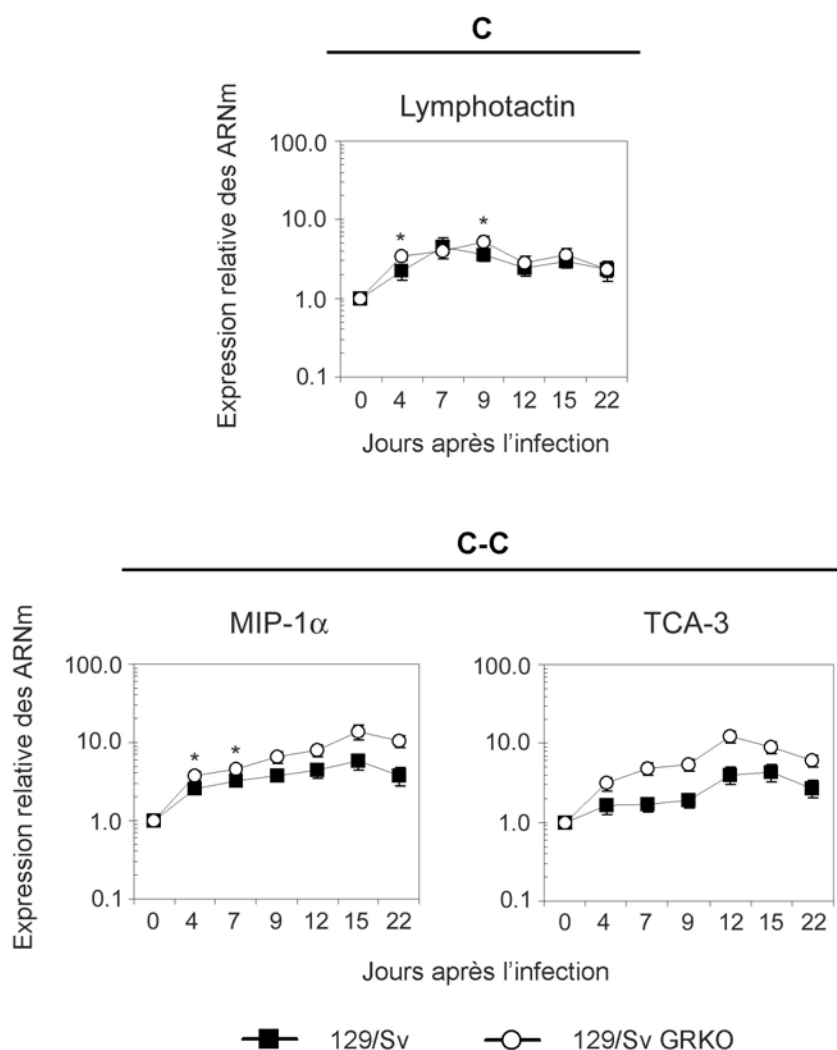


## Résultats complémentaires

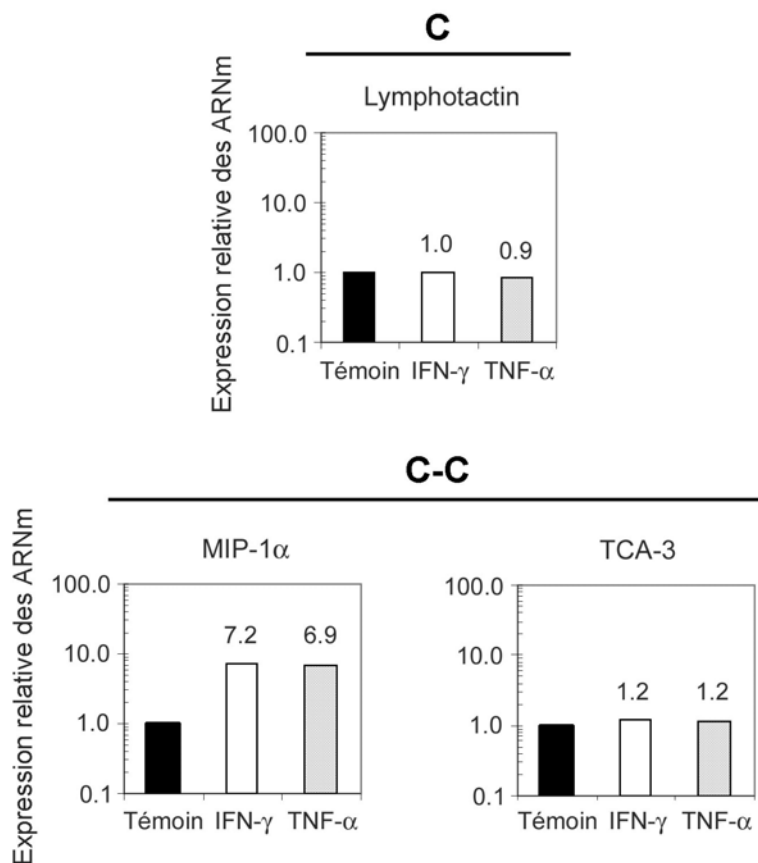
► L'infection orale avec *E. intestinalis* induit également au niveau du duodénum une sur-expression des ARNm spécifiques de MIP-1 $\alpha$ , de TCA-3 et de la lymphotactine, à la fois chez les souris sauvages 129/Sv et chez les souris déficientes 129/Sv GRKO (Figure 15). La cinétique d'expression des ARNm de la lymphotactine est sensiblement identique chez les deux catégories d'animaux. Par contre, les souris 129/Sv GRKO présentent un niveau d'expression des ARNm spécifiques des deux chimiokines MIP-1 $\alpha$  et TCA-3 toujours plus élevé par rapport à celui observé chez les souris sauvages.

La lymphotactine exerce son activité chimiotactique sur les lymphocytes T et les cellules NK, tandis que MIP-1 $\alpha$  participe au recrutement essentiellement des monocytes, des lymphocytes T et des lymphocytes B. Par ailleurs, TCA-3 est une chimiokine connue pour cibler préférentiellement les monocytes et les lymphocytes T effecteurs de type Th2. Son niveau d'expression est plus important chez les souris 129/Sv GRKO que chez les souris sauvages. Ce résultat est en accord avec l'observation d'une réponse cytokine à dominante Th2 chez les animaux 129/Sv GRKO suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.

► Au cours de test *in vitro*, nous avons également observé que le traitement des entérocytes de la lignée Mode-K par l'IFN- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$  induit une importante sur-expression des ARNm spécifiques de la chimiokine MIP-1 $\alpha$  (Figure 16). A l'inverse, aucune expression des ARNm spécifiques de la lymphotactin ou de TCA-3 n'a pu être détecté chez les entérocytes non traités ou traités avec l'IFN- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que les entérocytes contribuent probablement à la sécrétion de certaines chimiokines produites au cours de la réponse immunitaire intestinale mis en place suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.



**FIGURE 15 : Cinétique d'expression des ARNm spécifiques des chimiokines lymphotactine, MIP-1 $\alpha$  et TCA-3 au niveau du duodénum suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** Le niveau d'expression des ARNm spécifiques de la lymphotactine, de MIP-1 $\alpha$  et de TCA-3 est quantifiée par PCR en temps réel à différents jours p.i. (voir "*Materials and Methods*" dans l'article). Les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO non infectées servent de témoins (jour 0). Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type des résultats obtenus à partir de 3 souris. Les étoiles (\*) indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO, lorsque celle-ci n'est pas évidente. Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes aux résultats similaires.



**FIGURE 16 : Analyse du niveau d'expression des ARNm spécifiques des chimiokines lymphotactine, MIP-1 $\alpha$  et TCA-3 par les entérocytes de la lignée cellulaire Mode-K, après traitement par l'IFN- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$ .** Le niveau d'expression des ARNm spécifiques de la lymphotactine, de MIP-1 $\alpha$  et de TCA-3 a été quantifiée par PCR en temps réel (voir "*Materials and Methods*" dans l'article). Les cellules non traitées servent de témoins. Les données de cette figure sont représentatives de deux expériences indépendantes aux résultats similaires.

## **C- Etude de la réponse immune cellulaire au niveau systémique suite à l'infection orale par *Encephalitozoon intestinalis***

### **C-1 Analyse de la réponse immune cellulaire au niveau des ganglions mésentériques**

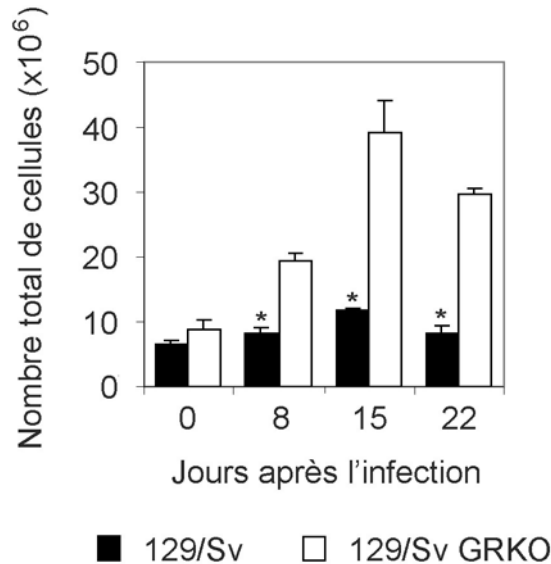
Pour appréhender le développement de l'immunité cellulaire systémique suite à l'ingestion des spores du parasite, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la réponse immune cellulaire mise en place au niveau des ganglions mésentériques. Dans ce but, nous avons étudié 1) la dynamique des sous-populations de lymphocytes ganglionnaires et 2) l'expression des ARNm spécifiques de diverses cytokines au niveau des ganglions mésentériques.

#### **C-1.1 Evolution du nombre de lymphocytes des ganglions mésentériques et de leur phénotype**

A différents jours p.i., les ganglions mésentériques ont été prélevés sur chaque souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO et le nombre total de cellules ganglionnaires ainsi que leur phénotype ont été déterminés, respectivement par comptage et par analyse en cytométrie de flux après un marquage en immunofluorescence directe.

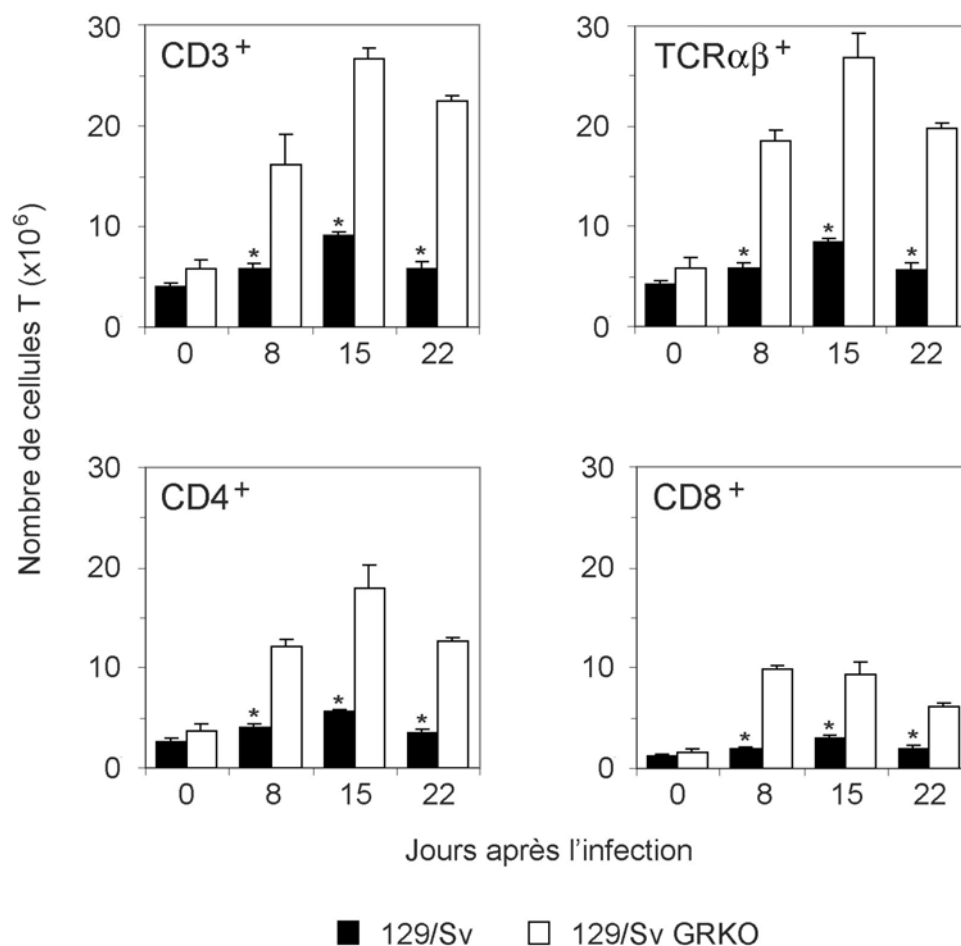
Nos résultats montrent que le nombre total de cellules ganglionnaires augmente de façon significative chez les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO suite à l'inoculation par la voie orale de spores d'*E. intestinalis* (Figure 17). Cette augmentation est observée dès le jour 8 p.i. et atteint son maximum au jour 15 p.i. chez les deux catégories d'animaux. Néanmoins, dès le 8<sup>ème</sup> jour de l'infection, le nombre de cellules récoltées à partir des ganglions mésentériques

des souris 129/Sv GRKO est en moyenne 2 à 4 fois plus important que celui obtenu à partir des ganglions mésentériques des souris sauvages.



**FIGURE 17 : Evolution du nombre total de cellules au niveau des ganglions mésentériques suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** Chaque histogramme représente le nombre moyen de lymphocyte ganglionnaires  $\pm$  l'écart-type (3 souris par point). \* différence significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin non infecté (jour 0). Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences supplémentaires.

De plus, l'analyse phénotypique en cytométrie de flux montre que l'augmentation du nombre total de cellules ganglionnaires suite à l'infection orale avec *E. intestinalis* s'accompagne d'une augmentation significative du nombre de lymphocytes ganglionnaires de phénotype  $CD3^+$ ,  $CD3^+TCR\alpha\beta^+$  mais aussi  $CD3^+CD4^+$  et  $CD3^+CD8\alpha\beta^+$ , à la fois chez les souris 129/Sv et chez les souris 129/Sv GRKO (Figure 17bis). D'une façon générale, le nombre de ces différentes cellules augmente à partir du jour 8 p.i. pour atteindre un maximum au jour 15 p.i. Cependant, l'amplitude de cette augmentation est 2 à 3 fois plus importante chez les animaux 129/Sv GRKO que chez les animaux 129/Sv.



**FIGURE 17bis : Dynamique des sous-populations lymphocytaires T au niveau des ganglions mésentériques suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** Les ganglions mésentériques de chaque souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO sont prélevés à différents jours p.i. et le nombre de cellules CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>TCRαβ<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> est ensuite déterminé par analyse en cytométrie de flux après un marquage en immunofluorescence directe. Chaque histogramme représente le nombre moyen de cellules positives ± l'écart-type (3 souris par point). \* différence significative (p<0,05) par rapport au témoin non infecté (jour 0). Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences supplémentaires.

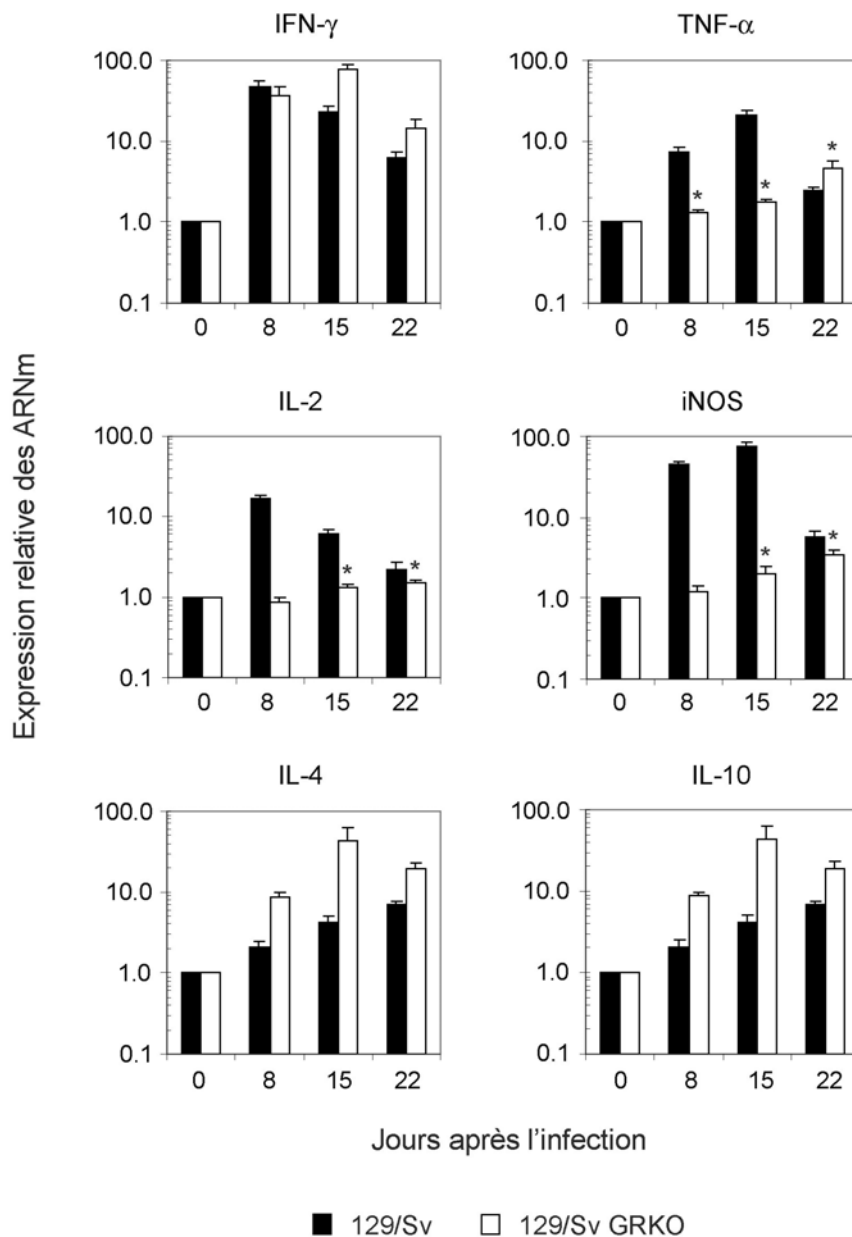
### **C-1.2 Cinétique d'expression des ARNm spécifiques des cytokines au niveau des ganglions mésentériques**

Nous avons ensuite analysé par la technique de PCR quantitative en temps réel après transcription inverse, l'expression des ARNm spécifiques de différentes cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 et IL-10) et de l'enzyme iNOS, au niveau des ganglions mésentériques suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.

Chez les souris sauvages 129/Sv, l'infection induit une importante sur-expression des ARNm spécifiques de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2, du TNF- $\alpha$  et de l'enzyme iNOS (Figure 18). Le niveau des ARNm de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 atteint son maximum au jour 8 p.i., puis diminue progressivement tout en restant, jusqu'à la fin de l'expérimentation, plus élevé que celui observé chez les souris témoins non infectées. En ce qui concerne le TNF- $\alpha$  et l'enzyme iNOS, l'expression des ARNm augmente également dès le 8<sup>ème</sup> jour de l'infection pour atteindre un pic au 15<sup>ème</sup> jour. Par ailleurs, nos résultats montrent une augmentation progressive de l'expression des ARNm de l'IL-4 et de l'IL-10 (cytokines de type Th2) suite à l'inoculation d'*E. intestinalis*.

Chez les souris 129/Sv GRKO, l'infection orale avec *E. intestinalis* induit également une importante augmentation de l'expression des ARNm de l'IFN- $\gamma$  au niveau des ganglions mésentériques (Figure 18). Par contre, les ARNm de l'IL-2, du TNF- $\alpha$  et de l'iNOS ne sont que très légèrement sur-exprimés suite à l'inoculation du parasite. A l'inverse, l'expression des cytokines de type Th2, IL-4 et IL-10, augmente fortement dès le 8<sup>ème</sup> jour suivant l'infection, pour atteindre un pic une semaine plus tard (jour 15 p.i.). Il est intéressant de noter que les taux d'ARNm de l'IL-4 et de l'IL-10 détectés chez les souris 129/Sv GRKO au cours de l'infection sont toujours plus élevés que ceux observés chez les souris sauvages (Figure 18).





**Figure 18 : Cinétique d'expression des ARNm spécifiques de diverses cytokines et de l'enzyme iNOS, au niveau des ganglions mésentériques suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** L'expression des ARNm spécifiques des cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 et IL-10, et de l'enzyme iNOS a été quantifiée par PCR en temps réel. Le niveau d'expression des différents gènes étudiés est normalisé par rapport à celui du gène de ménage GAPDH, puis rapporté relativement au niveau d'expression observé chez les souris non infectées (jour 0). Chaque histogramme représente la moyenne ( $\pm$  l'écart-type) des valeurs obtenues pour 3 souris. \* différence significative par rapport au témoin non infecté. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences supplémentaires.

En résumé, l'ensemble de nos résultats montre donc que le contrôle de l'infection due à *E. intestinalis* chez les souris sauvages est associée à une réponse cytokine de type Th1 au niveau des ganglions mésentériques. A l'inverse, l'altération de cette réponse associée à une augmentation de la réponse cytokine Th2 explique probablement en partie le caractère chronique et disséminé de l'infection chez les souris 129/Sv GRKO.

## **C-2 Analyse de la réponse immune cellulaire au niveau de la rate suite à l'infection orale avec *E. intestinalis***

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la réponse immune cellulaire mise en place au niveau de la rate, suite à l'inoculation par la voie orale de spores d'*E. intestinalis*. Dans cet objectif, nous avons étudié 1) l'expression des ARNm spécifiques de diverses cytokines au niveau de cet organe; 2) la dynamique des différentes sous-populations de splénocytes et leur état d'activation ; 3) la production de cytokines par les sous-populations de splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> ; et enfin 4) l'activité cytotoxique des splénocytes T CD8<sup>+</sup> suite à l'infection.

### **C-2.1 Cinétique d'expression des cytokines au niveau de la rate**

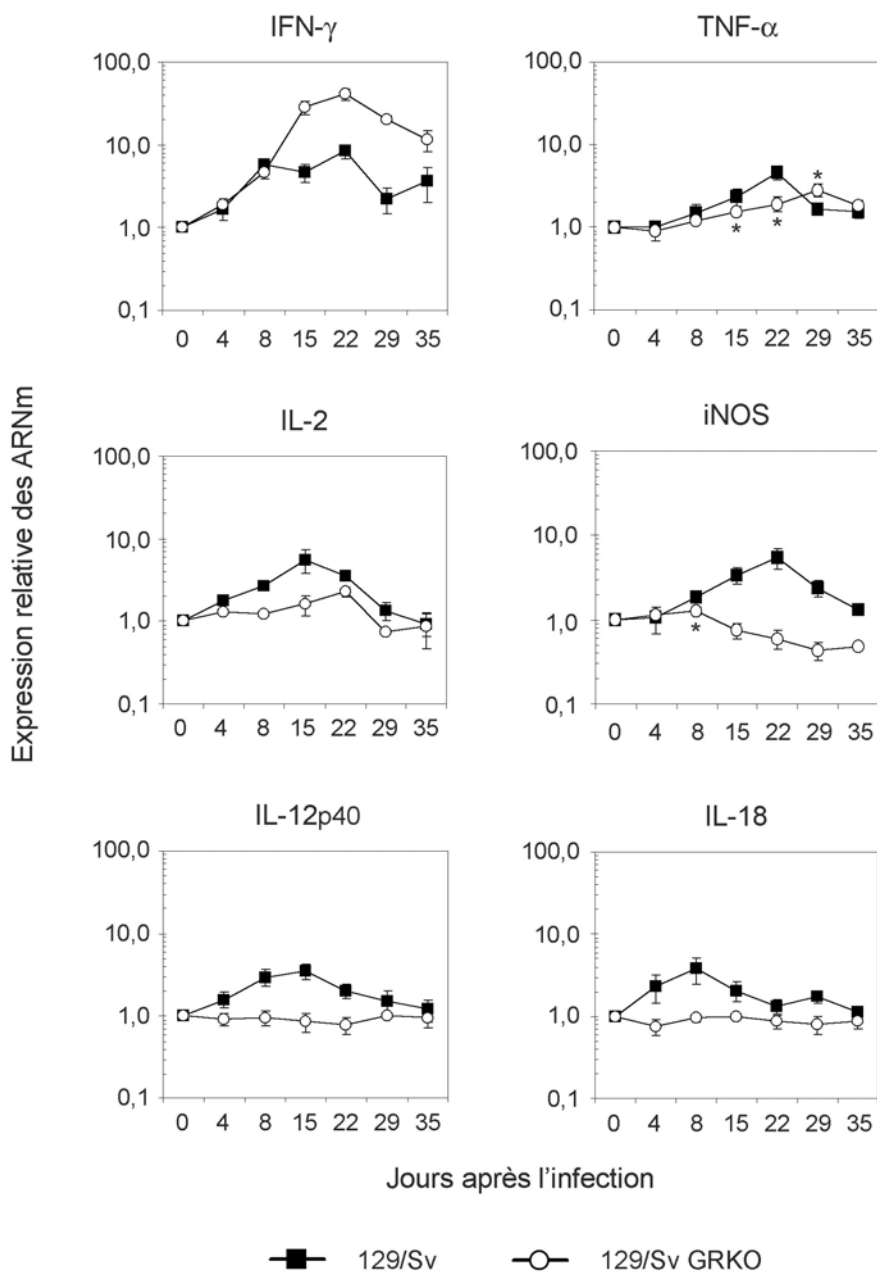
La cinétique d'expression des ARNm de diverses cytokines a été analysée par PCR en temps réel après transcription inverse au niveau de la rate des animaux infectés oralement avec *E. intestinalis*.

Comme illustré dans la Figure 19, l'infection orale avec *E. intestinalis* induit au niveau de la rate des souris 129/Sv une augmentation de l'expression des ARNm spécifiques des différentes cytokines Th1 IFN- $\gamma$ , IL-2 et TNF- $\alpha$  et de l'enzyme iNOS. Cette sur-expression est observée dès le 4<sup>ème</sup> jour de l'infection, en ce qui concerne l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2, tandis qu'elle

n'est détectée qu'à partir du jour 8 p.i. pour le TNF- $\alpha$  et l'iNOS. Par ailleurs, nos résultats font également apparaître une augmentation du niveau d'expression des ARNm de l'IL-18 et de l'IL-12p40 à partir du jour 4 p.i. Pour ces deux cytokines connues pour induire la production d'IFN- $\gamma$ , le taux d'ARNm atteint un maximum respectivement 8 et 15 jours après l'infection, puis diminue progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 19). Pour finir, nous avons également observé au niveau de la rate des animaux sauvages infectés, une sur-expression des ARNm spécifiques de l'IL-4 et de l'IL-10, respectivement à partir du jour 15 et du jour 8 p.i. (Figure 19bis). L'expression des ARNm de ces deux cytokines Th2 atteint un maximum 15 jours après l'inoculation des spores, puis diminue progressivement pour revenir à un niveau basal.

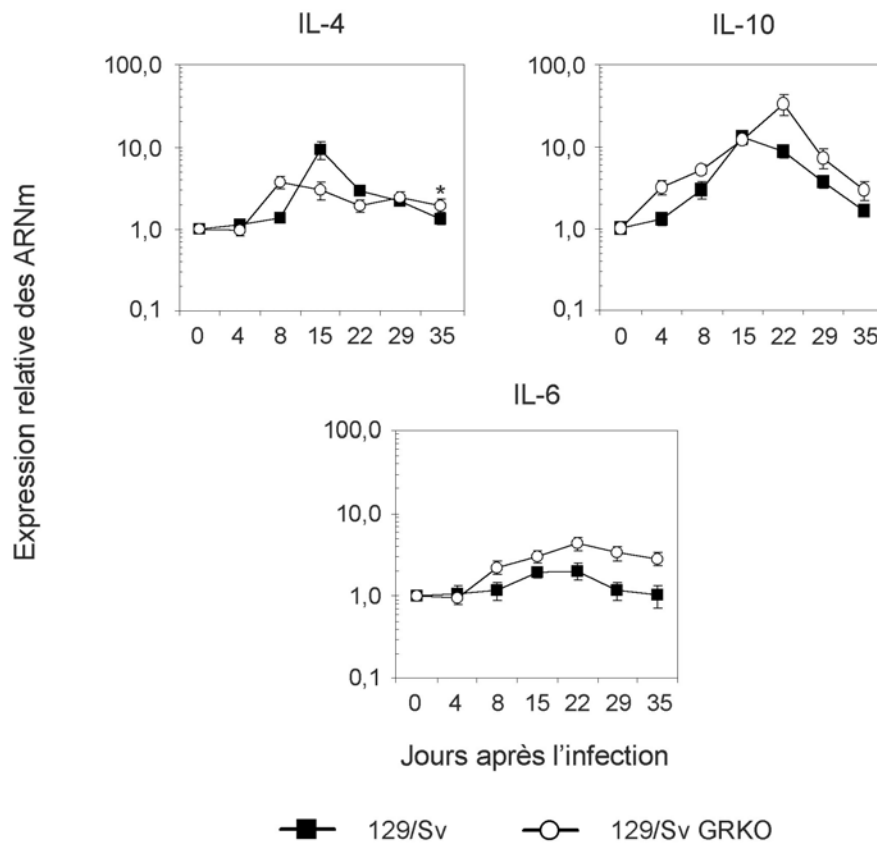
Chez les souris 129/Sv GRKO, l'analyse de la cinétique d'expression des ARNm au niveau de la rate suite à l'infection orale avec *E. intestinalis* révèle plusieurs différences importantes par rapport aux souris sauvages, à savoir :

- une sur-expression plus tardive (à partir du jour 15 p.i.) et moins importante des ARNm de l'IL-2 et du TNF- $\alpha$  (Figure 19).
- l'absence de sur-expression des ARNm spécifiques des cytokines IL-12p40 et IL-18, ainsi que des ARNm de l'enzyme iNOS (Figure 19).
- une augmentation plus précoce (dès le 4<sup>ème</sup> jour après l'infection) et/ou plus importante du niveau d'expression des ARNm des cytokines Th2, IL-4 et IL-10 (Figure 19bis).



**FIGURE 19 : Cinétique d'expression des ARNm spécifiques des cytokines Th1 et de l'enzyme iNOS, au niveau de la rate suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.**

L'expression des ARNm spécifiques des cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12p40 et IL-18, et de l'enzyme iNOS a été quantifiée par PCR en temps réel. Le niveau d'expression des différents gènes étudiés est normalisé par rapport à celui du gène de ménage GAPDH, puis rapporté relativement au niveau d'expression observé chez les souris non infectées (jour 0). Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  l'écart-type) des valeurs obtenues pour 3 souris. Les étoiles (\*) indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO, lorsque celle-ci n'est pas évidente. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences supplémentaires.



**FIGURE 19bis : Cinétique d'expression des ARNm spécifiques des cytokines Th2, IL-4 et IL-10, au niveau de la rate suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** L'expression des ARNm spécifiques de l'IL-4 et de l'IL-10 a été quantifiée par PCR en temps réel. Le niveau d'expression des différents gènes étudiés est normalisé par rapport à celui du gène de ménage GAPDH, puis rapporté relativement au niveau d'expression observé chez les souris non infectées (jour 0). Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  l'écart-type) des valeurs obtenues pour 3 souris. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences supplémentaires.

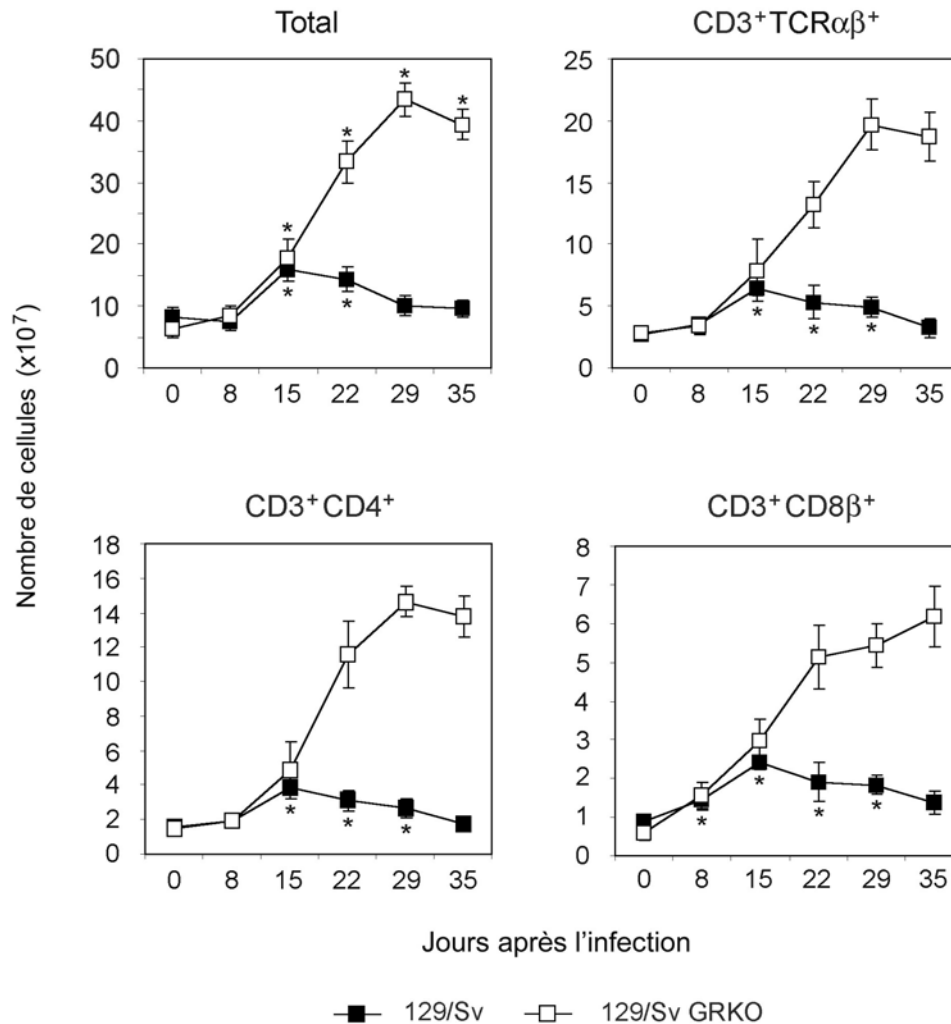
En résumé, en accord avec les observations effectuées au niveau de la muqueuse intestinale et des ganglions mésentériques, l'expression des cytokines de type Th1 (à l'exception de l'IFN- $\gamma$ , qui ne peut cependant agir faute de récepteur) est significativement altérée au niveau de la rate chez les souris 129/Sv GRKO infectées, tandis que l'expression des cytokines de type Th2 est intacte, voire augmentée. Ces résultats, qui confirment l'importance des cytokines Th1 dans le contrôle des infections microsporidiennes,

expliquent probablement en partie la susceptibilité plus grande des souris 129/Sv GRKO à l'infection orale avec *E. intestinalis*.

### **C-2.2 Evolution du nombre de splénocytes et de leur phénotype**

L'inoculation par la voie orale des spores induit une augmentation importante du nombre totale de splénocytes. Cette splénomégalie est visible dès le 15<sup>ème</sup> jour de l'infection, aussi bien chez les souris 129/Sv que chez les souris 129/Sv GRKO (Figure 20). Néanmoins, son amplitude et sa durée sont significativement plus importantes chez les animaux 129/Sv GRKO.

Afin de déterminer la nature des sous-populations de splénocytes qui répondent à l'infection, nous avons analysé la dynamique des différentes sous-populations lymphocytaires en cytométrie de flux après un marquage en immunofluorescence direct. Chez les souris 129/Sv tout comme chez les souris 129/Sv GRKO, l'infection induit une augmentation du nombre de cellules  $CD3^+TCR\alpha\beta^+$ ,  $CD3^+CD4^+$  et  $CD3^+CD8^+$  visible dès le 15<sup>ème</sup> jour p.i. (Figure 20). Chez les animaux sauvages, le nombre de ces cellules atteint un maximum au jour 15 p.i. puis diminue progressivement, tandis que chez les souris 129/Sv GRKO l'augmentation se poursuit jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ainsi, le nombre de cellules  $CD3^+CD4^+$  et  $CD3^+CD8^+$  chez les souris 129/Sv GRKO infectées depuis 35 jours est environ 10 fois plus important que celui observé chez ces mêmes souris non infectées (jour 0).



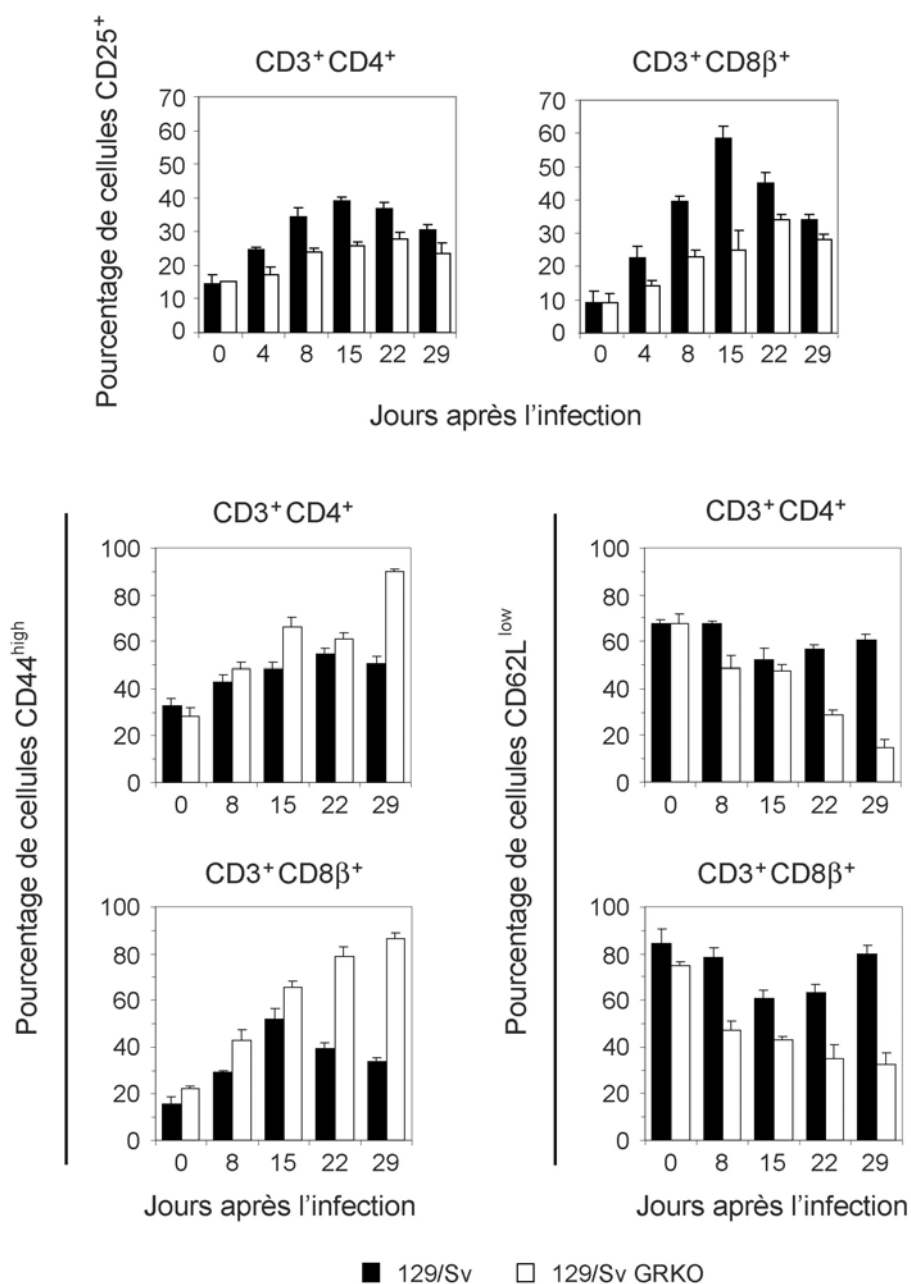
**FIGURE 20 : Dynamique des sous-populations lymphocytaires au niveau de la rate suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** A différents jours post-infection, le nombre total de splénocytes ainsi que le nombre de splénocytes CD3<sup>+</sup>TCRαβ<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup> ont été déterminés respectivement par comptage et par analyse en cytométrie de flux, après un marquage en immunofluorescence directe. Chaque point représente le nombre moyen de cellules ± l'écart-type (3 souris par point). Les souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO non infectées servent de témoins (jours 0). \* différence significative par rapport aux animaux témoins. Ces données sont représentatives de 2 expériences indépendantes ayant donné des résultats similaires.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de différentes molécules caractéristiques de l'activation des lymphocytes T, à savoir les marqueurs CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 ou IL-2R $\alpha$ ), CD44 et CD62L. CD25 est en effet une molécule rapidement exprimée à la surface des cellules T activées. De même, l'expression du marqueur CD44 est stable et très élevée sur les lymphocytes T activés, tandis que l'expression du marqueur CD62L n'est observée que chez les lymphocytes T naïfs.

Chez les souris 129/Sv, le pourcentage de cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> exprimant le marqueur CD25 augmente dès le 4<sup>ème</sup> jour après l'inoculation du parasite ; il atteint un pic au jour 15 p.i. puis diminue progressivement jusqu'au jour 29 p.i. (Figure 22). De même, la proportion de cellules CD44<sup>high</sup> au sein des sous-populations CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> augmente dès le jour 8 p.i., pour culminer au jour 22 p.i. (pour les CD4<sup>+</sup>) ou au jour 15 p.i. (pour les CD8<sup>+</sup>) et diminuer par la suite. L'évolution du pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> exprimant CD62L à un faible niveau (CD62L<sup>low</sup>) est logiquement inversée par rapport à ce qui est observé pour le CD44 (Figure 22).

Chez les souris 129/Sv GRKO, le pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> exprimant le marqueur CD25 (IL-2R $\alpha$ ) augmente également suite à l'infection orale avec *E. intestinalis* (Figure 22). Néanmoins, cette augmentation est non seulement plus tardive (à partir du jour 8 p.i. au lieu du jour 4 p.i.), mais aussi moins importante que celle observée chez les souris sauvages. Cette observation suggère donc que les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> des souris 129/Sv GRKO présentent un défaut d'activation par l'IL-2. Ce résultat est à rapprocher du déficit d'expression des ARNm spécifiques de cette cytokine mis en évidence chez ces animaux (voir Figure 19). A l'inverse, la proportion de cellules CD44<sup>high</sup> parmi les splénocytes CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> croît de façon plus importante chez les souris 129/Sv GRKO par rapport aux souris 129/Sv (Figure 22).





**FIGURE 22 : Expression des marqueurs CD25, CD44 et CD62L à la surface des splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** A différents jours p.i., le pourcentage de splénocytes T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> exprimant le marqueur CD25, ou exprimant fortement le marqueur CD44 (CD44<sup>high</sup>) ou faiblement le marqueur CD62L (CD62L<sup>low</sup>) a été déterminé par analyse en cytométrie de flux, après un double marquage en immunofluorescence directe. Chaque histogramme représente le pourcentage moyen de cellules CD25<sup>+</sup>, CD44<sup>high</sup> ou CD44<sup>low</sup> ± l'écart-type (3 souris par point). Les souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO non infectées servent de témoins (jours 0). Ces données sont représentatives de 3 expériences indépendantes aux résultats similaires.

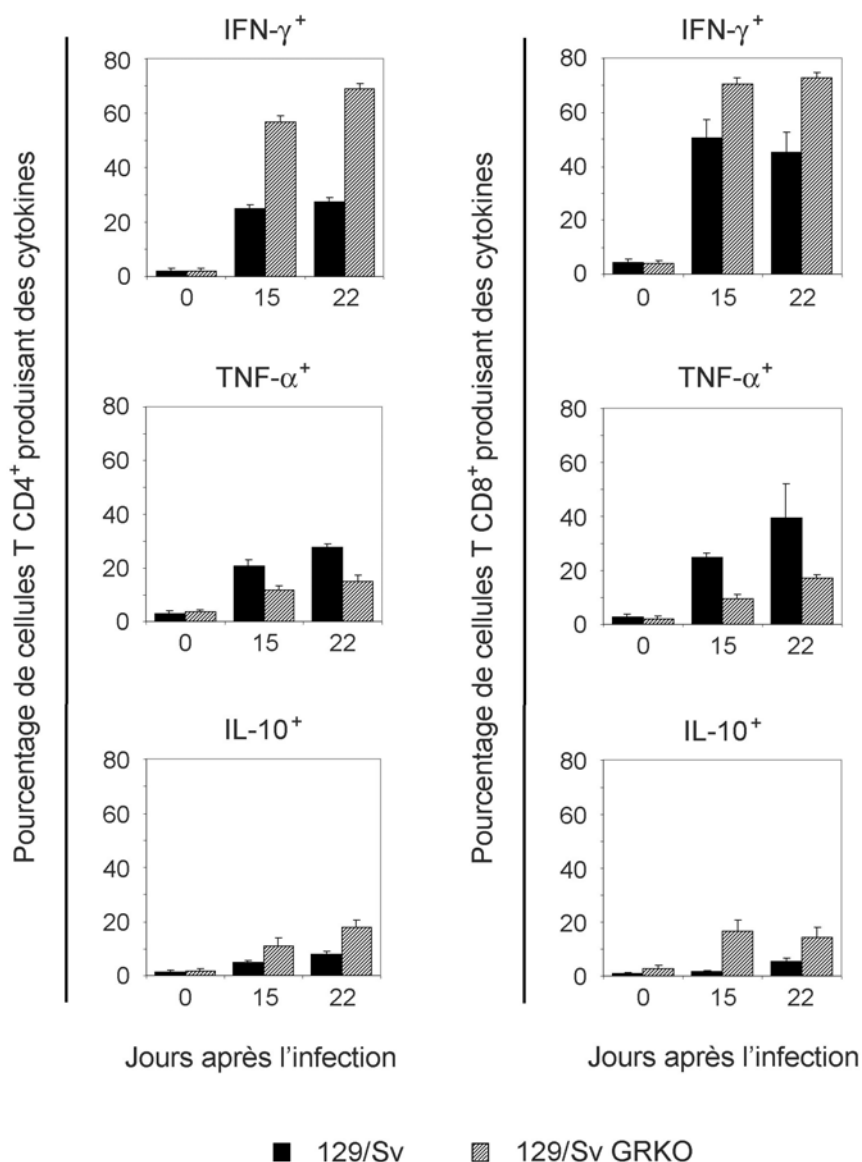
En résumé, l'ensemble de ces analyses phénotypiques montrent donc que l'infection par *E. intestinalis* induit chez les souris 129/Sv GRKO une expansion et une activation des sous-populations splénocytaires T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> plus importantes que chez les souris sauvages.

### **C-2.3 Production de cytokines par les splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>**

Pour étudier les propriétés fonctionnelles des splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> au cours de l'infection, nous avons analysé dans un premier temps la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-4 et d'IL-10 par ces cellules, grâce à la technique de détection des cytokines intracellulaires en cytométrie de flux.

Chez les souris sauvages, l'infection orale avec *E. intestinalis* se traduit par une augmentation importante du pourcentage de splénocytes T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN- $\gamma$  ou du TNF- $\alpha$  (Figure 23). A l'inverse, la proportion de cellules positives pour l'IL-10 au sein de ces deux sous-populations n'augmente que très légèrement (suite à l'inoculation du parasite, tandis que l'IL-4 n'est jamais détectée.

Chez les souris 129/Sv GRKO, nos résultats montrent également une augmentation de la proportion de splénocytes T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> sécrétant l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou l'IL-10 au jour 15 p.i. et au jour 22 p.i. (Figure 23). Par comparaison avec les animaux sauvages infectés, le pourcentage de cellules positives pour l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-10 est plus important chez les animaux 129/Sv GRKO infectés, tandis que celui des cellules positives pour le TNF- $\alpha$  est plus faible. L'absence du récepteur à l'IFN- $\gamma$  entraîne donc une altération de la réponse cytokine des sous-populations de splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> suite à l'infection, qui se traduit par une sécrétion moindre de TNF- $\alpha$  et une production plus importante d'IL-10.



**FIGURE 23 : Cytokines produites par les splénocytes T CD4 $^+$  ou T CD8 $^+$  suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.** La production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-4 et d'IL-10 par les splénocytes T CD4 $^+$  ou T CD8 $^+$  provenant des souris 129/Sv et 129/Sv GRKO, a été analysée par la technique de détection des cytokines intracellulaires en cytométrie de flux. Chaque histogramme représente le pourcentage moyen de cellules produisant la cytokine étudiée  $\pm$  l'écart-type (3 souris par point). Les souris 129/Sv et 129/Sv GRKO non infectées servent de témoins (jour 0). Cette expérience a été reproduite deux fois avec des résultats similaires.

#### **C-2.4 Activité cytotoxique *in vitro* des splénocytes T CD8<sup>+</sup> suite à l'infection orale avec *E. intestinalis***

Nous avons ensuite testé le pouvoir cytotoxique des splénocytes CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> des souris infectées avec *E. intestinalis* 15 jours auparavant. Les résultats obtenus montrent que les splénocytes CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> provenant, soit des souris 129/Sv infectées, soit des souris 129/Sv GRKO infectées, sont cytotoxiques vis-à-vis de macrophages péritonéaux isolés à partir de souris 129/Sv et parasités avec *E. intestinalis* (Tableau 10). Par contre, ces cellules ne manifestent aucune cytotoxicité à l'encontre de macrophages péritonéaux non infectés. Cette cytotoxicité est de plus restreinte génétiquement par le CMH, puisque des splénocytes CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> provenant de souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO (H-2<sup>b</sup>) infectées sont incapables de lyser des macrophages de souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>) parasités ou non (données non publiées). Par ailleurs, nous avons également observé que l'activité cytotoxique des splénocytes CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> provenant des souris 129/Sv GRKO infectées (31,7%) est plus faible que celle des splénocytes CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> purifiés à partir des souris sauvages 129/Sv infectées (55,1%).

En conclusion, bien que l'ensemble de ces résultats n'ait pas été reproduit, ces observations suggèrent néanmoins que les lymphocytes T CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> des souris 129/Sv GRKO présentent une activité cytotoxique spécifique moins efficace suite à l'infection orale avec *E. intestinalis*.

**TABLEAU 10 : Activité cytotoxique des splénocytes T CD8 $\alpha^+$  des souris 129/Sv ou 129/Sv GRKO, infectées oralement avec *E. intestinalis*.**

Origine des splénocytes CD8 $\alpha^+$ (cellules effectrices)	Cellules cibles (macrophages péritonéaux)	% de cytotoxicité
129/Sv infectées	infectés	55,1
	non infectés	0,7
129/Sv non infectées	infectés	0,0
	non infectés	0,0
129/Sv GRKO infectées	infectés	31,7
	non infectés	1,2
129/Sv GRKO non infectées	infectés	0,2
	non infectés	0,0

Quinze jours après l'inoculation par la voie orale de spores d'*E. intestinalis*, les splénocytes T CD8 $\alpha^+$  sont purifiés à partir de la rate des souris 129/Sv et 129/Sv GRKO, à l'aide du système Mini MACS (voir Matériels et Méthodes) puis testés pour leur activité cytotoxique. Les expériences de cytotoxicité *in vitro* sont effectuées en utilisant comme cellules cibles des macrophages péritonéaux de souris 129/Sv, infectés avec *E. intestinalis*, puis marqués au  $^{51}\text{Cr}$ . Les splénocytes T CD8 $\alpha^+$  sont mis en contact avec les macrophages pendant 4 h à 37°C en utilisant un ratio effecteurs/cibles de 50/1.

*DISCUSSION GÉNÉRALE*  
*CONCLUSIONS*

Comme d'autres infections opportunistes, telles que la pneumocystose ou la cryptosporidiose, l'impact des microsporidioses en pathologie humaine est la conséquence directe du SIDA. Les études concernant l'immunité anti-microsporidienne sont donc récentes et peu nombreuses. Elles ont été réalisées en grande partie chez la souris inoculée par la voie intrapéritonéale avec des spores d'*Encephalitozoon cuniculi*, une espèce de microsporidie rarement rencontrée chez l'homme. Néanmoins, la transmission naturelle de ces parasites s'effectue selon toute vraisemblance par l'ingestion des spores présentes dans l'environnement, et la voie orale est donc probablement la voie naturelle d'entrée des microsporidies dans l'organisme.

Notre étude présente l'originalité de s'intéresser à la réponse immune mise en place chez la souris après une infection orale avec des spores d'*Encephalitozoon intestinalis*, l'une des deux espèces les plus fréquemment rencontrée chez les patients infectés par le VIH.

► Les entérocytes de l'épithélium intestinal sont les premières cellules infectées par *E. intestinalis* (Kotler et Orenstein, 1998; Franzen et Müller, 1999). En conséquence, la réponse immune mucoale constitue la première ligne de défense de l'hôte contre ce parasite suite à l'ingestion des spores. Il était donc intéressant d'étudier les caractéristiques de la réponse immunitaire mise en place au niveau de la muqueuse intestinale. De par leur localisation, les lymphocytes intraépithéliaux (LIEs) de l'intestin sont les premières cellules immunocompétentes rencontrées par le parasite. Plusieurs études récentes ont déjà démontré l'importance des LIEs dans l'immunité anti-parasitaire au niveau de la muqueuse intestinale. L'inoculation par voie orale avec *Toxoplasma gondii* se traduit ainsi chez la souris par une

augmentation transitoire du nombre de LIEs de phénotype T CD8 $\alpha\beta^+$ , cytotoxiques pour des cellules épithéliales infectées *in vitro* par le parasite (Chardès et *al.*, 1994). Par ailleurs, des LIEs sensibilisés sont capables de transférer une immunité protectrice contre *T. gondii*, lorsqu'ils sont injectés à des souris naïves (Buzoni-Gatel et *al.*, 1997; Lepage et *al.*, 1998; Buzoni-Gatel et *al.*, 1999). Les LIEs sont également impliqués dans la résistance aux cryptosporidioses, autres parasitoses opportunistes rencontrées chez les patients infectés par le VIH (McDonald et *al.*, 1996; Culshaw et *al.*, 1997; Adjei et *al.*, 2000).

Nos expériences démontrent qu'une infection orale avec des spores d'*E. intestinalis* induit chez les souris sauvages une augmentation du nombre total de LIEs au niveau de l'épithélium intestinal, preuve que ces cellules se mobilisent pour lutter contre l'infection en colonisant le point d'entrée du parasite. Le suivi des sous-populations lymphocytaires CD4 $^+$  et CD8 $\alpha\beta^+$  de l'épithélium intestinal par cytométrie en flux nous a permis de constater que ces deux sous-populations augmentaient de façon transitoire (entre le 7<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour) suite à l'inoculation des spores. Cette augmentation est plus ou moins corrélée avec la présence du parasite au niveau du duodénum, site de multiplication privilégié d'*E. intestinalis*; l'ADN parasitaire est en effet détecté au niveau du duodénum des souris sauvages à partir du 8<sup>ème</sup> jour de l'infection et jusqu'au 22<sup>ème</sup> jour. Une telle dynamique lymphocytaire a également été observée suite à l'infection orale de souris sauvages avec la microsporidie *E. cuniculi* (données non publiées). L'ensemble de ces observations suggère donc l'implication des LIEs dans la protection contre les microsporidies. Afin de mieux cerner le rôle de ces cellules, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité *in vitro*, en utilisant la sous-population de LIEs CD8 $\alpha\beta^+$  comme cellules effectrices. Les LIEs CD8 $\alpha\beta^+$  provenant de souris inoculées depuis 12 jours exercent ainsi une activité cytotoxique envers des macrophages infectés avec *E. intestinalis*. De plus, cette cytotoxicité semble restreinte génétiquement par les molécules du CMH de classe I, puisque ces cellules sont incapables de lyser des macrophages parasités provenant de



souris d'haplotype différent. L'ensemble de ces résultats nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle les LIEs CD8 $\alpha\beta^+$  seraient impliqués dans la protection contre *E. intestinalis*, notamment en détruisant les entérocytes infectés par le parasite. L'activité cytotoxique des LIEs pourrait s'exercer par l'intermédiaire de la voie perforine/granzymes, mais aussi par d'autres mécanismes tels que le système Fas/FasL (Beagley et Husband, 1998).

Plusieurs démarches expérimentales apparaissent nécessaires, pour confirmer ou infirmer l'importance des LIEs dans l'immunité anti-microsporidienne. Des tests de cytotoxicité *in vitro*, utilisant des entérocytes infectés avec *E. intestinalis* comme cellules cibles, permettront dans un premier temps de confirmer la capacité des LIEs CD8 $\alpha\beta^+$  à lyser ces cellules et dans un deuxième temps de tester l'activité cytotoxique des autres sous-populations de LIEs, à savoir les LIEs CD8 $\alpha\alpha^+$ , mais aussi les LIEs CD4 $^+$ . Des expériences de transfert chez des souris immunodéficientes SCID fourniront la démonstration définitive du rôle important ou non des LIEs dans la protection contre *E. intestinalis*, ainsi que la nature de la sous-population responsable de cette protection. Enfin, l'analyse du profil cytokinique et chimiokinique des LIEs permettra de parfaire la caractérisation fonctionnelle de ces cellules.

► Outre les LIEs, la défense de la muqueuse intestinale est également assurée par les entérocytes. Au contact de certains pathogènes ou médiateurs de l'inflammation, ces cellules contribuent en effet activement à l'élaboration et/ou au maintien de la réponse immunitaire, constituant ainsi des éléments majeurs de l'immunité des muqueuses intestinales. Plusieurs études ont montré que les entérocytes sont capables de sécréter des chimiokines et des cytokines, suite à l'interaction avec un pathogène (contact, pénétration, infection) (Stadnyk, 2002). L'infection d'entérocytes murin et/ou humain avec *Toxoplasma gondii* ou *Cryptosporidium parvum* stimule ainsi la sécrétion de plusieurs chimiokines (Laurent et al., 1997; Buzoni-Gatel et al., 2001; Lacroix-Lamande et al., 2002; Mennechet et al., 2002). Dans ce

travail, nous rapportons que l'infection d'entérocytes murins de la lignée Mode-K (haplotype H-2<sup>k</sup>) avec *E. intestinalis* induit la production d'IP-10, de MIG, d'i-TAC, de MIP-1 $\beta$ , de RANTES et de MIP-2. Ce résultat indique clairement que les entérocytes sont probablement une source primaire de chimiokines au cours des microsporidioses intestinales. Des expériences utilisant des cellules épithéliales fraîchement isolées à partir de l'intestin de souris 129/Sv permettront de confirmer cette hypothèse.

*In vivo*, chez les souris sauvages, l'infection avec *E. intestinalis* se traduit par l'induction précoce et à des niveaux élevés des chimiokines IP-10, MIG, i-TAC, mais aussi dans une moindre mesure des chimiokines MCP-1, MIP-1 $\beta$  et RANTES au niveau du duodénum. Ces chimiokines sont connues pour être impliquées dans le recrutement sélectif et l'activation des macrophages et des lymphocytes T, deux types cellulaires jouant un rôle important dans le contrôle et l'éradication des parasites intracellulaires. De plus, MIP-1 $\beta$  et RANTES sont chimiotactiques plus particulièrement envers les lymphocytes T de type Th1, qui produisent de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-2 et de l'IL-12 (Siveke et Hamann, 1998).

L'analyse du profil cytokinique chez les souris sauvages montre que l'infection avec *E. intestinalis* induit la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2, d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  au niveau de la muqueuse intestinale, mais aussi des ganglions mésentériques et de la rate. Nous avons également observé dans ces trois compartiments l'induction de l'enzyme iNOS, responsable de la synthèse du NO. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus dans le laboratoire (El Fakhry et *al.*, 1998; El Fakhry et *al.*, 2001a), mais aussi avec ceux rapportés par diverses équipes (au niveau de la rate) chez les souris infectées par la voie intrapéritonéale avec *E. cuniculi* (Khan et Moretto, 1999; Khan et *al.*, 2001).

Pour compléter notre approche, il nous apparaît intéressant d'une part, de caractériser les cellules présentes au niveau de l'épithélium intestinal au cours de l'infection, et d'autre part,

de déterminer la nature des cellules produisant les diverses chimiokines et cytokines étudiées. Une telle analyse sera réalisée en utilisant les techniques classiques d'immunohistochimie sur des coupes d'intestin.

► Nos expériences montrent également que l'infection s'accompagne chez les souris sauvages d'une augmentation transitoire du nombre de splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> activés (CD25<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> CD62<sup>low</sup>). Ces cellules produisent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  susceptibles d'activer les macrophages à tuer le parasite grâce à un mécanisme NO dépendant. Plusieurs études ont en effet démontré que des macrophages activés par l'IFN- $\gamma$  et/ou le TNF- $\alpha$  sont capables d'éliminer les microsporidies grâce à la production de NO (Didier et Shadduck, 1994; Didier et *al.*, 1994; Didier, 1995). Par ailleurs, nous avons observé que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de la rate des souris infectées depuis 15 jours sont capables d'exercer une activité cytotoxique spécifique de l'antigène et restreinte par le CMH contre des macrophages péritonéaux infectés avec *E. intestinalis*. Cette cytotoxicité s'exerce probablement par l'intermédiaire de la voie perforine/granzymes comme cela a déjà été rapporté chez la souris infectée avec *E. cuniculi* (Khan et *al.*, 1999). En résumé, les souris sauvages développent une réponse immune à médiation cellulaire qui permet le contrôle de l'infection et son éradication.

► Plusieurs études ont démontré que l'IFN- $\gamma$  joue un rôle central dans l'immunité anti-microsporidienne. Les souris génétiquement déficientes pour l'IFN- $\gamma$  succombent ainsi à l'infection intrapéritonéale avec *E. cuniculi*, de même que les souris sauvages traitées avec un anticorps neutralisant anti-IFN- $\gamma$  (Khan et Moretto, 1999). De plus, notre équipe a montré que les souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  (souris GRKO) inoculées oralement avec *E. intestinalis* sont incapables d'éliminer le parasite et développent une infection chronique et disséminée (Achbarou et *al.*, 1996; El Fakhry et *al.*, 2001b). Néanmoins, la nature du ou des

mécanismes par lesquels l'IFN- $\gamma$  intervient dans l'immunité anti-microsporidienne demeure encore assez floue. L'IFN- $\gamma$  est une cytokine sécrétée par les cellules phagocytaires, les lymphocytes T activés et/ou les cellules NK après activation. Les effets de ce médiateur de la réponse immune sont multiples : soit directs par la production de molécules effectrices comme le NO ou les radicaux libre de l'oxygène, soit indirects par l'induction de la synthèse de cytokines comme le TNF- $\alpha$ , l'amplification de la présentation antigénique (CMH de classe I et II) et de la phagocytose ou encore l'induction de l'apoptose (Boehm et *al.*, 1997). De plus, l'IFN- $\gamma$  joue un rôle crucial dans la polarisation de la réponse immune vers un profil de type Th1 associé à une immunité à médiation cellulaire.

Afin de mieux cerner le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans l'immunité protectrice contre les infections microsporidienne, nous avons également étudié la réponse immune mise en place chez les souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  (GRKO), suite à l'inoculation par la voie orale d'*E. intestinalis*. Des expériences de PCR en temps réel nous ont permis de démontrer que ces animaux ont une charge parasitaire élevée dans de nombreux tissus, notamment le duodenum, le foie et les reins.

Dans tous les compartiments analysés (duodénum, ganglions mésentériques et rate), les souris GRKO présentent une expression réduite de l'IL-2 et du TNF- $\alpha$ , ainsi qu'un défaut d'expression de l'IL-12p40 et de l'enzyme iNOS. A l'inverse, l'expression des cytokines Th2 IL-4, IL-5 et IL-10 est plus précoce et/ou amplifiée par rapport à celle observée chez les souris sauvages. La balance Th1/Th2 est donc altérée chez les souris GRKO en faveur d'une réponse Th2, inefficace pour assurer le contrôle de l'infection. L'importance de l'IL-12 dans la résistance aux microsporidioses a été démontrée par des études antérieures utilisant des anticorps neutralisants ou des souris génétiquement déficientes (Khan et Moretto, 1999). Le rôle du NO est quant à lui plus controversé. En effet, *in vitro* la destruction du parasite par les

macrophages activés par l'IFN- $\gamma$  et/ou le TNF- $\alpha$  semble dépendre de la production de NO. Néanmoins, les souris déficientes pour l'enzyme iNOS survivent à l'infection avec *E. cuniculi* (Khan et Moretto, 1999) ou avec *E. intestinalis* (données personnelles). Il est donc fort probable que le NO ne constitue pas l'unique molécule effectrice, via laquelle les macrophages activés assurent l'élimination du parasite. Les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont probablement impliqués dans ces mécanismes, comme le suggère la susceptibilité accrue des souris dépourvues d'activité oxydative vis-à-vis de l'infection avec *E. intestinalis* (Didier et al., 2001).

➤ Au niveau de la muqueuse intestinale, l'altération du profil cytokinique s'accompagne d'une altération du profil de sécrétion des chimiokines. De façon logique, les souris GRKO infectées présentent un défaut d'expression des chimiokines induites par l'IFN- $\gamma$ , à savoir l'IP-10, MIG et l'i-TAC. Nos observations révèlent également que chez ces animaux, l'induction de MCP-1, MIP-1 $\beta$  et RANTES est plus faible par rapport aux souris sauvages, tandis que celle de KC et de MIP-2 est plus importante. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez les souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$ , infectées avec *Cryptosporidium parvum* (Lacroix-Lamande et al., 2002), *Toxoplasma gondii* (Amichay et al., 1996) ou *Trypanosoma cruzi* (Aliberti et al., 2001). Dans ces modèles murins, le profil d'expression des chimiokines suite à l'infection présente des similitudes avec celui que nous avons observé chez les souris GRKO infectées avec *E. intestinalis*. De plus, chez ces animaux, le recrutement des lymphocytes T au site de l'infection est diminué ou altéré. L'ensemble de ces observations nous permet donc d'émettre l'hypothèse, selon laquelle le recrutement des lymphocytes T au niveau du duodénum pourrait être altéré chez les souris GRKO infectées par *E. intestinalis*, ce qui expliquerait l'incapacité de ces animaux à contenir l'infection au niveau de l'intestin.

Cependant, nos expériences montrent que le nombre de LIEs présents au niveau de l'intestin augmente de façon plus importante chez les souris GRKO que chez les souris sauvages. Ce résultat est donc en contradiction avec l'hypothèse d'une diminution du recrutement des lymphocytes T au niveau du duodénum chez ces animaux. Il n'est pas exclu pour autant que les propriétés fonctionnelles des LIEs des souris GRKO soit différentes de celles des LIEs des souris sauvages, expliquant pourquoi malgré la présence de ces cellules en grand nombre au niveau de la muqueuse intestinale la multiplication et la dissémination du parasite ne sont pas contrôlées. Il apparaît donc intéressant d'envisager plusieurs expériences visant à caractériser ces LIEs quant à leur profil d'expression des récepteurs aux chimiokines, des cytokines mais aussi leur activité cytotoxique. Par ailleurs, l'importance de certaines chimiokines dans l'immunité anti-microsporidienne (notamment les chimiokines IP-10, MIG et i-TAC induite par l'IFN- $\gamma$ ) pourra être testée en utilisant des souris génétiquement déficientes pour l'une de ces molécules.

► L'étude de la dynamique des sous-populations lymphocytaires au niveau de la rate et des ganglions mésentériques nous a permis de montrer que l'infection avec *E. intestinalis* induit chez les souris GRKO une expansion des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, dont l'amplitude est beaucoup plus importante que celle observée chez les souris sauvages. Une analyse phénotypique plus poussée a révélé que les sous-populations de splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> sont fortement activées (CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup>). D'autre part, une proportion plus importante de ces cellules produit de l'IFN- $\gamma$ , ce qui est également le signe d'une activation plus intense. L'ensemble de ces résultats peut s'expliquer en partie par une stimulation antigénique plus importante chez les souris GRKO, en raison de la charge parasitaire plus grande chez ces animaux mais aussi du caractère chronique et disséminé de l'infection. Des études antérieures utilisant ces souris GRKO avaient déjà permis de constater chez ces animaux l'existence

d'une prolifération et d'une activation plus intense des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> suite à l'infection par *Leishmania major* ou à l'induction de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Schijns et al., 1994; Swihart et al., 1995; Chu et al., 2000).

Malgré un nombre plus important de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, les souris GRKO sont incapables de contrôler la multiplication d'*E. intestinalis*. Ceci s'explique probablement en partie par une altération fonctionnelle de ces cellules. Nous avons en effet observé que le pourcentage de splénocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> sécrétant du TNF- $\alpha$  était réduit chez les souris GRKO, tandis que la proportion de T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> produisant de l'IL-4 et de l'IL-10 était légèrement augmentée. Ces résultats corroborent ceux concernant l'expression des cytokines. Par ailleurs, des expériences préliminaires suggèrent que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de la rate des animaux GRKO manifestent une activité cytotoxique réduite vis-à-vis de macrophages parasités par *E. intestinalis* en comparaison avec les splénocytes T CD8<sup>+</sup> de la rate. L'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  sont deux cytokines connues pour être impliquées dans l'induction et le maintien des réponses cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> (Plate et al., 1988; Utermohlen et al., 1996; Ely et al., 1999). L'expression de l'IL-2 est diminuée chez les souris GRKO tandis que l'IFN- $\gamma$  ne peut pas agir du fait de l'absence de son récepteur. Ceci pourrait expliquer l'efficacité cytotoxique moindre des T CD8<sup>+</sup> chez les souris GRKO.

*RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES*



**Accoceberry, I., Carriere, J., Thellier, M., Biligui, S., Danis, M. and Datry, A.** (1997a) Rat model for the human intestinal microsporidian *Enterocytozoon bieneusi*. J Eukaryot Microbiol 44, 83S.

**Accoceberry, I., Greiner, P., Thellier, M., Achbarou, A., Biligui, S., Danis, M. and Datry, A.** (1997b) Rabbit model for human intestinal microsporidia. J Eukaryot Microbiol 44, 82S.

**Accoceberry, I., Thellier, M., Desportes-Livage, I., Achbarou, A., Biligui, S., Danis, M. and Datry, A.** (1999) Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi*. J Clin Microbiol 37, 4107-4112.

**Achbarou, A., Ombrouck, C., Gneragbe, T., Charlotte, F., Renia, L., Desportes-Livage, I. and Mazier, D.** (1996) Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. Parasite Immunol 18, 387-392.

**Achbarou, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Prigneau, O., Bouladoux, N., Datry, A., Mazier, D. and Desportes-Livage, I.** (1999) Production of immunological probes raised against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two microsporidian species causing intestinal infections in man. J Eukaryot Microbiol 46, 32S-33S.

**Adjei, A.A., Shrestha, A.K., Castro, M. and Enriquez, F.J.** (2000) Adoptive transfer of immunity with intraepithelial lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected severe combined immunodeficient mice. Am J Med Sci 320, 304-309.

**Aldras, A.M., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., Shadduck, J.A. and Didier, E.S.** (1994) Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 32, 608-612.

**Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G.B. and Sher, A.** (2000) CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. Nat Immunol 1, 83-87.

**Aliberti, J.C., Souto, J.T., Marino, A.P., Lannes-Vieira, J., Teixeira, M.M., Farber, J., Gazzinelli, R.T. and Silva, J.S.** (2001) Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol 158, 1433-1440.

**Alican, I. and Kubes, P.** (1996) A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. Am J Physiol 270, G225-G237.

**Amara, M.O., Franetich, J.F., Bouladoux, N., Mazier, D., Eisenbrand, G., Marko, D., Meijer, L., Doerig, C. and Desportes-Livage, I.** (2001) *In vitro* activity of antimetabolic compounds against the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. J Euk Microbiol, 99S-100S.

**Amichay, D., Gazzinelli, R.T., Karupiah, G., Moench, T.R., Sher, A. and Farber, J.M.** (1996) Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN- $\gamma$  with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol* 157, 4511-4520.

**Arstila, T., Arstila, T.P., Calbo, S., Selz, F., Malassis-Seris, M. and Vassali, P.** (2000) Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J Exp Med* 191, 823-834.

**Asmuth, D.M., DeGirolami, P.C., Federman, M., Ezratty, C.R., Pleskow, D.K., Desai, G. and Wanke, C.A.** (1994) Clinical features of microsporidiosis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 18, 819-825.

**Bacchi, C.J., Weiss, L.M., Lane, S., Frydman, B., Valasinas, A., Reddy, V., Sun, J.S., Marton, L.J., Khan, I.A., Moretto, M., Yarlett, N. and Wittner, M.** (2002) Novel synthetic polyamines are effective in the treatment of experimental microsporidiosis, an opportunistic AIDS-associated infection. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 55-61.

**Baggiolini, M.** (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.

**Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V. and Undeen, A.H.** (1994) Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J Invertebr Pathol* 64, 100-106.

**Balbani, G.** (1882) Sur les microsporidies ou psorospermies des articules. *C R Hebd Seances Acad Sci Paris* 95, 1168-1171.

**Barrett, T.A., Gajewski, T.F., Danielpour, D., Chang, E.B., Beagley, K.W. and Bluestone, J.A.** (1992) Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol* 149, 1124-1130.

**Beagley, K.W. and Husband, A.J.** (1998) Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function. *Crit Rev Immunol* 18, 237-254.

**Beckers, P.J.A., Derks, G.J.M.M., Van Gool, T., Rietveld, F.R.J. and Sauerwein, R.W.** (1996) *Encephalitozoon intestinalis*-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 34, 282-285.

**Becnel, J.J. and Andreadis, T.G.** (1999) Microsporidia of insects. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 447-501.

**Biderre, C., Pages, M., Metenier, G., Canning, E.U. and Vivarès, C.P.** (1995) Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol* 74, 229-231.

**Bigliardi, E., Riparbelli, M.G., Selmi, M.G., Lanzarini, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M. and Sacchi, L.** (1998) Mechanisms of microsporidial cell division : ultrastructural study on *Encephalitozoon hellem*. *J Eukaryot Microbiol* 45, 347-351.

**Bigliardi, E. and Sacchi, L.** (2001) Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect* 3, 373-379.

**Bigliardi, E., Selmi, M.G., Lupetti, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M. and Sacchi, L.** (1996) Microsporidian spore wall : ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *J Eukaryot Microbiol* 43, 181-186.

**Binder, D. and Kundig, T.M.** (1991) Antiviral protection by CD8<sup>+</sup> versus CD4<sup>+</sup> T cells. CD8<sup>+</sup> T cells correlating with cytotoxic activity in vitro are more efficient in antivaccinia virus protection than CD4-dependent IL. *J Immunol* 146, 4301-4307.

**Bismanis, J.E.** (1970) Detection of latent murine nosematosis and growth of *Nosema cuniculi* in cell cultures. *Can J Microbiol* 16, 237-242.

**Black, S.S., Steinohrt, L.A., Bertucci, D.C., Rogers, L.B. and Didier, E.S.** (1997) *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Pathol* 34, 189-198.

**Bland, P.W.** (1998) Mucosal T cell-epithelial cell interactions. *Chem Immunol* 71, 40-63.

**Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C.** (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.

**Bornay-Llinares, F.J., da Silva, A.J., Moura, H., Schwartz, D.A., Visvesvara, G.S., Pieniazek, N.J., Cruz-Lopez, A., Hernandez-Jauregui, P., Guerrero, J. and Enriquez, F.J.** (1998) Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J Infect Dis* 178, 820-826.

**Braunfuchsova, P., Kopecky, J., Ditrich, O. and Koudela, B.** (1999) Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 46, 91-95.

**Braunfuchsova, P., Salat, J. and Kopecky, J.** (2001) CD8<sup>+</sup> T lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int J Parasitol* 31, 681-686.

**Braunfuchsova, P., Salat, J. and Kopecky, J.** (2002) Comparison of the significance of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Parasitol* 88, 797-799.

**Breitenmoser, A.C., Mathis, A., Burgi, E., Weber, R. and Deplazes, P.** (1999) High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology* 118, 447-453.

**Brenier-Pinchart, M.P., Pelloux, H., Derouich-Guergour, D. and Ambroise-Thomas, P.** (2001) Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* 17, 292-296.

**Bryan, R.T. and Schwartz, D.A.** (1999) Epidemiology of microsporidiosis. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 502-516.

**Bryan, R.T., Weber, R. and Schwartz, D.A.** (1997) Microsporidiosis in patients who are not infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 24, 534-535.

**Bustin, S.A.** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.

**Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Mennechet, F.J., Martin, V., Lepage, A.C., Schwartzman, J.D. and Kasper, L.H.** (2001) Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120, 914-924.

**Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Moretto, M., Dimier-Poisson, I.H., Lepage, A.C., Bout, D.T. and Kasper, L.H.** (1999) Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *J Immunol* 162, 5846-5852.

**Buzoni-Gatel, D., Lepage, A.C., Dimier-Poisson, I.H., Bout, D.T. and Kasper, L.H.** (1997) Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 158, 5883-5889.

**Bywater, J.E. and Kellet, B.S.** (1979) Humoral immune response to natural infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 13, 293-297.

**Cali, A., Kotler, D.P. and Orenstein, J.M.** (1993) *Septata intestinalis* N. G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol* 40, 101-112.

**Cali, A., Meisler, D.M., Rutherford, I., Lowder, C.Y., McMahon, J.T., Longworth, D.L. and Bryan, R.T.** (1991) Corneal microsporidiosis in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg* 44, 463-468.

**Cali, A. and Owen, R.L.** (1990) Intracellular development of *Enterocytozoon*, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patient. *J Protozool* 37, 145-155.

**Cali, A. and Takvorian, P.M.** (1999) Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 85-128.

**Cali, A., Takvorian, P.M., Lewin, S., Rendel, M., Sian, C.S., Wittner, M., Tanowitz, H.B., Keohane, E. and Weiss, L.M.** (1998) *Brachiola vesicularum*, n. g., n. sp., a new microsporidium associated with AIDS and myositis. *J Eukaryot Microbiol* 45, 240-251.

**Campbell, N., Yio, X.Y., So, L.P., Li, Y. and Mayer, L.** (1999) The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol Rev* 172, 315-324.

**Canning, E.U.** (1988) Nuclear division and chromosome cycle in microsporidia. *Biosystems* 21, 333-340.

**Canning, E.U. and Hollister, W.S.** (1987) Microsporidia of mammals - widespread pathogens or opportunistic curiosities? *Parasitol Today* 3, 267-273.

**Canning, E.U. and Lom, J.** (1986) The microsporidia of vertebrates. In: Academic Press, New York, N.Y., p. 1-16.

**Carr, A., Marriott, D., Field, A., Vasak, E. and Cooper, D.A.** (1998) Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet* 351, 256-261.

**Carter, L.L. and Swain, S.L.** (1997) Single cell analyses of cytokine production. *Curr Opin Immunol* 9, 177-182.

**Cavalier-Smith, T.** (1987) Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326, 332-333.

**Chardès, T., Buzoni-Gatel, D., Lepage, A., Bernard, F. and Bout, D.** (1994) *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8  $\alpha/\beta^+$  Thy-1<sup>+</sup> gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J Immunol* 153, 4596-4603.

**Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

**Chu, C.Q., Wittmer, S. and Dalton, D.K.** (2000) Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192, 123-128.

**Chupp, G.L., Alroy, J., Adelman, L.S., Breen, J.C. and Skolnik, P.R.** (1993) Myositis due to *Pleistophora* (Microsporidia) in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 16, 15-21.

**Clark, I.A. and Rockett, A.** (1996) Nitric oxide and parasite disease. *Adv Parasitol* 37, 1-56.

**Conteas, C.N., Berlin, O.G., Lariviere, M.J., Pandhumas, S.S., Speck, C.E., Porchen, R. and Nakaya, T.** (1998a) Examination of the prevalence and seasonal variation of intestinal microsporidiosis in the stools of persons with chronic diarrhea and human immunodeficiency virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 58, 559-561.

**Conteas, C.N., Berlin, O.G., Speck, C.E., Pandhumas, S.S., Lariviere, M.J. and Fu, C.** (1998b) Modification of the clinical course of intestinal microsporidiosis in acquired immunodeficiency syndrome patients by immune status and anti-human immunodeficiency virus therapy. *Am J Trop Med Hyg* 58, 555-558.

**Conteas, C.N., Sowerby, T.M., Berlin, O.G.W., Dahlan, F., Nguyen, A., Porschen, R., Donovan, J., Lariviere, M. and Orenstein, J.M.** (1996) Fluorescence techniques for diagnosing intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid, and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhea. *Arch Pathol Lab Med* 120, 847-853.

**Conteas, C.N., Berlin, O.G., Ash, L.R. and Pruthi, J.S.** (2000) Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *Am J Trop Med Hyg* 63, 121-127.

**Coyle, C.M., Kent, M., Tanowitz, H.B., Wittner, M. and Weiss, L.M.** (1998) TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent. *J Infect Dis* 58, 515-518.

**Coyle, C.M., Wittner, M., Kotler, D.P., Noyer, C., Orenstein, J.M., Tanowitz, H.B. and Weiss, L.M.** (1996) Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by

polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. Clin Infect Dis 23, 1002-1006.

**Culshaw, R.J., Bancroft, G.J. and McDonald, V.** (1997) Gut intraepithelial lymphocytes induce immunity against *Cryptosporidium* infection through a mechanism involving gamma interferon production. Infect Immun 65, 3074-3079.

**Curgy, J.J., Vavra, J. and Vivarès, C.P.** (1980) Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. Biol Cell 38, 49-51.

**De Groote, M.A., Visvesvara, G., Wilson, M.L., Pieniazek, N.J., Slemenda, S.B., daSilva, A.J., Leitch, G.J., Bryan, R.T. and Reves, R.** (1995) Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS : successful therapy with albendazole. J Infect Dis 171, 1375-1378.

**De Winter, H., Elewaut, D., Turovskaya, O., Huflejt, M., Shimeld, C., Hagenbaugh, A., Binder, S., Takahashi, I., Kronenberg, M. and Cheroutre, H.** (2002) Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. Gastroenterology 122, 1829-1841.

**Del Aguila, C., Izquierdo, F., Navajas, R., Pieniazek, N.J., Miro, G., Alonso, A.I., Da Silva, A.J. and Fenoy, S.** (1999) *Enterocytozoon bieneusi* in animals : rabbits and dogs as new hosts. J Eukaryot Microbiol 46, 8S-9S.

**Del Aguila, C., Lopez-Velez, R., Fenoy, S., Turrientes, C., Cobo, J., Navajas, R., Visvesvara, G.S., Croppo, G.P., Da Silva, A.J. and Pieniazek, N.J.** (1997) Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. J Clin Microbiol 35, 1862-1866.

**Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A. and Vivares, C.P.** (1998) On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. Mol Microbiol 29, 825-834.

**Deplazes, P., Mathis, A., Baumgartner, R., Tanner, I. and 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.

**Deplazes, P., Mathis, A., van Saanen, M., Iten, A., Keller, R., Tanner, I., Glauser, M.P., Weber, R. and Canning, E.U.** (1998) Dual microsporidial infection due to *Vittaforma corneae* and *Encephalitozoon hellem* in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 27, 1521-1524.

**Desplazes, P., Mathis, A. and Weber, R.** (2000) Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. In: F. Petry (Ed) Cryptosporidiosis and microsporidiosis, Vol. 6. Karger, Basel, p. 236-260.

**Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. and Modigliani, R.** (1985) Occurrence of a new microsporidan : *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J Protozool 32, 250-254.

**Desportes-Livage, I.** (2000) Biology of microsporidia. In: F. Petry (Ed) Cryptosporidiosis and microsporidiosis, Vol. 6, Contrib Microbiol. Karger, Basel, p. 140-165.

**Desportes-Livage, I., Doumbo, O., Pichard, E., Hilmarsdottir, I., Traore, H.A., Maiga, II, el Fakhry, Y. and Dolo, A.** (1998) Microsporidiosis in HIV- seronegative patients in Mali. Trans R Soc Trop Med Hyg 92, 423-424.

**Didier, E.S.** (1995) Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. Parasite Immunol 17, 405-412.

**Didier, E.S.** (1997) Effects of albendazole, fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. Antimicrob Agents Chemother 41, 1541-1546.

**Didier, E.S.** (2000) Immunology of microsporidiosis. In: F. Petry (Ed) Cryptosporidiosis and microsporidiosis, Vol. 6, Contributions to microbiology. Karger, Basel, p. 193-208.

**Didier, E.S., Aldras, A. and Shadduck, J.A.** (1992) Serological studies in simian microsporidiosis. Am J Trop Med Hyg 47, 168-169.

**Didier, E.S., Bertucci, D.C., Green, L.C., Stovall, M.E. and Didier, P.J.** (2001) *Encephalitozoon cuniculi* infection in mice with the chronic granulomatous disease (CGD) disorder. J Eukaryot Microbiol, 79S-80S.

**Didier, E.S. and Bessinger, G.T.** (1999) Host-parasite relationships in microsporidiosis : animal models and immunology. In: M. Wittner (Ed) The Microsporidia and Microsporidiosis, Washington, D.C., p. 225-257.

**Didier, E.S., Didier, P.J., Friedberg, D.N., Stenson, S.M., Orenstein, J.M., Yee, R.W., Tio, F.O., Davis, R.M., Vossbrinck, C., Millichamp, N. and et al.** (1991) Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. J Infect Dis 163, 617-621.

**Didier, E.S., Didier, P.J., Snowden, K.F. and Shadduck, J.A.** (2000) Microsporidiosis in mammals. Microbes Infect 2, 709-720.

**Didier, E.S., Rogers, L.B., Dieterich, D.T., Orenstein, J.M., Aldras, A.M., Davis, R., Friedberg, D.N., Gourley, W.K., Lembach, R., Lowder, C.Y., Meisler, D.M., Rutherford, I., Yee, R.W. and Shadduck, J.A.** (1993) Serological studies in human microsporidia infections. AIDS 7, S8-S11.

**Didier, E.S. and Shadduck, J.A.** (1988) Modulated immune responsiveness associated with experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in BALB/c mice. Lab Anim Sci 38, 680-684.

**Didier, E.S. and Shadduck, J.A.** (1994) IFN-gamma and LPS induce murine macrophages to kill *Encephalitozoon cuniculi* in vitro. J Eukaryot Microbiol 41, 34S.

**Didier, E.S., Snowden, K.F. and Shadduck, J.A.** (1998) Biology of microsporidian species infecting mammals. Adv Parasitol 40, 283-320.

**Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphey-Corb, M., Bohm, R. and Shadduck, J.A.** (1994) Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol* 41, 1-11.

**Didier, E.S., Visvesvara, G.S., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., De Groot, M.A. and Vossbrinck, C.R.** (1996) A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J Clin Microbiol* 34, 2835-2837.

**Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C. and Shadduck, J.A.** (1995) Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111, 411-421.

**Dore, G.J., Marriott, D.J., Hing, M.C., Harkness, J.L. and Field, A.S.** (1995) Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in nine patients infected with the human immunodeficiency virus : response to therapy with albendazole. *Clin Infect Dis* 21, 70-76.

**Dowd, S.E., Gerba, C.P. and Pepper, I.L.** (1998) Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 64, 3332-3335.

**Dunon, D., Cooper, M.D. and Imhof, B.A.** (1993) Thymic origin of embryonic intestinal gamma/delta T cells. *J Exp Med* 177, 257-263.

**Ebert, E.C.** (1999) *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut* 44, 342-346.

**Edlind, T.D., Li, J., Visvesvara, G.S., Vodkin, M.H., McLaughlin, G.L. and Katiyar, S.K.** (1996) Phylogenetic analysis of  $\beta$ -tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol* 5, 359-367.

**El Fakhry, Y., Achbarou, A., Desportes, I. and Mazier, D.** (2001a) Resistance to *Encephalitozoon intestinalis* is associated with interferon- $\gamma$  and interleukin-2 cytokines in infected mice. *Parasite Immunol* 23, 297-303.

**El Fakhry, Y., Achbarou, A., Desportes-Livage, I. and Mazier, D.** (1998) *Encephalitozoon intestinalis* : humoral responses in interferon- $\gamma$  receptor knockout mice infected with a microsporidium pathogenic in AIDS patients. *Exp Parasitol* 89, 113-121.

**El Fakhry, Y., Achbarou, A., Franetich, J.F., Desportes-Livage, I. and Mazier, D.** (2001b) Dissemination of *Encephalitozoon intestinalis*, a causative agent of human microsporidiosis, in IFN- $\gamma$  receptor knockout mice. *Parasite Immunol* 23, 19-25.

**Elliott, S.N. and Wallace, J.L.** (1998) Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol* 33, 792-803.

**Ely, K.H., Kasper, L.H. and Khan, I.A.** (1999) Augmentation of the CD8<sup>+</sup> T cell response by IFN-gamma in IL-12-deficient mice during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 162, 5449-5454.



**Enriquez, F.J., Dittrich, O., Palting, J.D. and Smith, K.** (1997) Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. microsporidial infections by using a panspecific anti-exospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 35, 724-729.

**Enriquez, F.J., Taren, D., Cruz-Lopez, A., Muramoto, M., Palting, J.D. and Cruz, P.** (1998a) Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clin Infect Dis* 26, 1227-1229.

**Enriquez, F.J., Wagner, G., Fragoso, M. and Dittrich, O.** (1998b) Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development in vitro. *Parasitology* 117, 515-520.

**Fast, N.M. and Keeling, P.J.** (2001) Alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase E1 from the microsporidian *Nosema locustae* : mitochondrion-derived carbon metabolism in microsporidia. *Mol Biochem Parasitol* 117, 201-209.

**Fast, N.M., Logsdon, J.M., Jr. and Doolittle, W.F.** (1999) Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae* : evidence for a microsporidia-fungi relationship and spliceosomal intron loss. *Mol Biol Evol* 16, 1415-1419.

**Fergusson, A.** (1977) Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 18, 921-937.

**Ferrick, D.A., Schrenzel, M.D., Mulviana, T., Hsieh, B., Ferlin, W.G. and Lepper, H.** (1995) Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 255-257.

**Field, A.S., Marriott, D.J., Milliken, S.T., Brew, B.J., Canning, E.U., Kench, J.G., Darveniza, P. and Harkness, J.L.** (1996) Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 34, 2803-2811.

**Flegel, T.W. and Pasharawipas, T.** (1995) A proposal for typical eukaryotic meiosis in microsporidians. *Can J Microbiol* 41, 1-11.

**Foissner, I. and Foissner, W.** (1995) *Ciliatosporidium platyophryae* nov. gen., nov. spec. (Microspora incerta sedis), a parasite of *Platyophrya terricola* (Ciliophora, Colpodea). *Eur J Protistol* 31, 248-259.

**Foucault, C. and Drancourt, M.** (2000) Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb Pathog* 28, 51-58.

**Franzen, C. and Müller, A.** (2001) Microsporidiosis : human diseases and diagnosis. *Microbes Infect* 3, 389-400.

**Franzen, C. and Müller, A.** (1999) Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 12, 243-285.

**Franzen, C., Schwartz, D.A., Visvesvara, G.S., Muller, A., Schwenk, A., Salzberger, B., Fatkenheuer, G., Hartmann, P., Mahrle, G., Diehl, V. and et al.** (1995) Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 21, 1480-1484.

**Friedberg, D.N. and Ritterband, D.C.** (1999) Ocular microsporidiosis. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 293-314.

**Frixione, E., Ruiz, L., Santillan, M., de Vargas, L.V., Tejero, J.M. and Undeen, A.H.** (1992) Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motil Cytoskelet* 22, 38-50.

**Fujihashi, K., McGhee, J.R., Yamamoto, M., Peschon, J.J. and Kiyono, H.** (1997) An interleukin-7 internet for intestinal intraepithelial T cell development: knockout of ligand or receptor reveal differences in the immunodeficient state. *Eur J Immunol* 27, 2133-2138.

**Gannon, J.** (1980) The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab Anim* 14, 189-192.

**Garcia, L.S.** (2002) Laboratory identification of the microsporidia. *J Clin Microbiol* 40, 1892-1901.

**Gelfanov, V., Gelfanova, V., Lai, Y.G. and Liao, N.S.** (1996) Activated alpha beta-CD8<sup>+</sup>, but not alpha alpha-CD8<sup>+</sup>, TCR-alpha beta<sup>+</sup> murine intestinal intraepithelial lymphocytes can mediate perforin-based cytotoxicity, whereas both subsets are active in Fas-based cytotoxicity. *J Immunol* 156, 35-41.

**Germot, A., Philippe, H. and Le Guyader, H.** (1997) Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol* 87, 159-168.

**Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M.** (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6, 995-1001.

**Goguel, J., Katlama, C., Sarfati, C., Maslo, C., Leport, C. and Molina, J.M.** (1997) Remission of AIDS-associated intestinal microsporidiosis with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 11, 1658-1659.

**Goodman, T. and Lefrançois, L.** (1988) Expression of the gamma delta T-cell receptor on intestinal CD8<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes. *Nature* 333, 855-858.

**Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R.** (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126, 131-138.

**Guerard, A., Rabodonirina, M., Cotte, L., Liguory, O., Piens, M.A., Daoud, S., Picot, S. and Touraine, J.L.** (1999) Intestinal microsporidiosis occurring in two renal transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Transplantation* 68, 699-707.

**Guy-Grand, D., Cerf-Bensussan, N., Malissen, B., Malassis-Seris, M., Briottet, C. and Vassalli, P.** (1991) Two gut intraepithelial CD8<sup>+</sup> lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 173, 471-481.

**Guy-Grand, D., Cuenod-Jabri, B., Malassis-Seris, M., Selz, F. and Vassalli, P.** (1996) Complexity of the mouse gut T cell immune system: identification of two distinct natural killer T-cell intraepithelial lineages. *Eur J Immunol* 26, 2248-2256.

**Guy-Grand, D., Griscelli, C. and Vassalli, P.** (1978) The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J Exp Med* 148, 1661-1677.

**Guy-Grand, D. and Vassalli, P.** (1993) Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5, 247-252.

**Guy-Grand, D. and Vassalli, P.** (2002) Gut intraepithelial lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 14, 255-259.

**Hartskeerl, R.A., Schuitema, A.R. and de Wachter, R.** (1993) Secondary structure of the small subunit ribosomal RNA sequence of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Nucleic Acids Res* 21, 1489.

**Hartskeerl, R.A., Van Gool, T., Schuitema, A.R., Didier, E.S. and Terpstra, W.J.** (1995) Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993 : reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110, 277-285.

**Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E. and Shires, J.** (2001) Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2, 997-1003.

**Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M.** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994.

**Hermanek, J., Koudela, B., Kucerova, Z., Ditrich, O. and Travnicek, J.** (1993) Prophylactic and therapeutic immune reconstitution of SCID mice infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 40, 287-291.

**Hershberg, R.M. and Mayer, L.F.** (2000) Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 21, 123-128.

**Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R.** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030.

**Hirt, R.P., Healy, B., Vossbrinck, C.R., Canning, E.U. and Embley, T.M.** (1997) A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix* : molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol* 7, 995-998.

**Hirt, R.P., Logsdon, J.M., Jr., Healy, B., Dorey, M.W., Doolittle, W.F. and Embley, T.M.** (1999) Microsporidia are related to Fungi : evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 580-585.

**Hollister, W.S., Canning, E.U., Weidner, E., Field, A.S., Kench, J. and Marriott, D.J.** (1996) Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n.g., n.sp. after in vitro isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Parasitology* 112, 143-154.

**Horuk, R.** (2001) Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 313-335.

**Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M.** (1993) Immune response in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor. *Science* 259, 1742-1745.

**Hutin, Y.J.F., Sombardier, M.-N., Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F., Modai, J. and Molina, J.M.** (1998) Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection : a case-control study. *J Infect Dis* 178, 904-907.

**Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P.W., Matsushima, K. and Yoshie, O.** (1999) Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11, 81-88.

**Inagaki-Ohara, K., Nishimura, H., Mitani, A. and Yoshikai, Y.** (1997) Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing  $\gamma\delta$  T cell receptor in mice. *Eur J Immunol* 27, 2885-2891.

**Innes, J.R.** (1970) Parasitic infections of the nervous system of animals. *Ann N Y Acad Sci* 174, 1042-1047.

**Ishihara, R. and Hayashi, Y.** (1968) Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. *J Invert Pathol* 11, 377-385.

**James, S.L.** (1995) Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev* 59, 533-547.

**Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F. and Guy-Grand, D.** (1990) Subsets of CD3<sup>+</sup> (T cell receptor  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$ ) and CD3<sup>-</sup> lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 20, 1097-1103.

**Kamaishi, T., Hashimoto, T., Nakamura, Y., Nakamura, F., Murata, S., Okada, N., Okamoto, K., Shimizu, M. and Hasegawa, M.** (1996) Protein phylogeny of translation elongation factor EF-1 $\alpha$  suggests microsporidians are extremely ancient eukaryotes. *J Mol Evol* 42, 257-263.

**Kasper, L.H. and Buzoni-Gatel, D.** (2001) Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun* 69, 1-8.

**Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. and Vivarès, C.P.** (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450-453.

**Keeling, P.J.** (2003) Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet Biol* 38, 298-309.

**Keeling, P.J. and Doolittle, W.F.** (1996) Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol Biol Evol* 13, 1297-1305.

**Keeling, P.J. and Fast, N.M.** (2002) Microsporidia : biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56, 93-116.

**Keeling, P.J., Luker, M.A. and Palmer, J.D.** (2000) Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol* 17, 23-31.

**Keeling, P.J. and McFadden, G.I.** (1998) Origins of microsporidia. *Trends Microbiol* 6, 19-23.

**Keohane, E.M., Orr, G.A., Zhang, H.S., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M. and Weiss, L.M.** (1998) The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Mol Biochem Parasitol* 94, 227-236.

**Keohane, E.M. and Weiss, L.M.** (1998) Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitol* 45, 117-127.

**Keohane, E.M. and Weiss, L.M.** (1999) The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 196-224.

**Khan, I.A. and Moretto, M.** (1999) Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 67, 1887-1893.

**Khan, I.A., Moretto, M. and Weiss, L.M.** (2001) Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect* 3, 401-405.

**Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H. and Moretto, M.** (1999) CD8<sup>+</sup> CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 162, 6086-6091.

**Kilshaw, P.J. and Karecla, P.** (1997) Structure and function of the mucosal T-cell integrin  $\alpha_E\beta_7$ . *Biochem Soc Trans* 25, 433-439.

**Kim, S.K., Reed, D.S., Heath, W.R., Carbone, F. and Lefrançois, L.** (1997) Activation and migration of CD8 T cells in the intestinal mucosa. *J Immunol* 159, 4295-4306.

**Kondova, I., Mansfield, K., Buckholt, A., Stein, B., Widmer, G., Carville, A., Lackner, A. and Tzipori, S.** (1998) Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bieneusi* from humans and rhesus macaques in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 66, 5515-5519.

**Kotler, D. and Orenstein, J.M.** (1999) Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 258-292.

**Kotler, D.P. and Orenstein, J.M.** (1998) Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv Parasitol* 40, 321-349.

**Koudela, B., Vitovec, J., Kucerova, Z., Ditrich, O. and Travnicek, J.** (1993) The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol* 40, 279-286.

**Kraehenbuhl, J.P. and Neutra, M.R.** (1992) Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 72, 853-879.

**Kunstyr, I., Lev, L. and Naumann, S.** (1986) Humoral antibody response of rabbits to experimental infection with *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Parasitol* 21, 223-232.

**Lacey, E.** (1985) The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18, 885-936.

**Lacroix-Lamande, S., Mancassola, R., Naciri, M. and Laurent, F.** (2002) Role of gamma interferon in chemokine expression in the ileum of mice and in a murine intestinal epithelial cell line after *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 70, 2090-2099.

**Larsson, J.I.R.** (1999) Identification of microsporidia. *Acta Protozool* 38, 161-197.

**Larsson, R.** (1986) Ultrastructure, function, and classification of microsporidia. *Prog Protistol* 1, 325-390.

**Laurent, F., Eckmann, L., Savidge, T.C., Morgan, G., Theodos, C., Naciri, M. and Kagnoff, M.F.** (1997) *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect Immun* 65, 5067-5073.

**Ledford, D.K., Overman, M.D., Gonzalvo, A., Cali, A., Mester, S.W. and Lockey, R.F.** (1985) Microsporidiosis myositis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 102, 628-630.

**Lefrançois, L.** (1991) Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* 147, 1746-1751.

**Lefrançois, L., Fuller, B., Huleatt, J.W., Olson, S. and Puddington, L.** (1997) On the front lines: intraepithelial lymphocytes as primary effectors of intestinal immunity. *Springer Semin Immunopathol* 18, 463-475.

**Lefrançois, L. and Goodman, T.** (1989) In vivo modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression in TCR- $\gamma\delta^+$  intraepithelial lymphocytes. *Science* 243, 1716-1718.

**Lefrançois, L. and Olson, S.** (1994) A novel pathway of thymus-directed T lymphocyte maturation. *J Immunol* 153, 987-995.

**Lefrançois, L. and Olson, S.** (1997) Cutting edge: reconstitution of the extrathymic intestinal T cell compartment in the absence of irradiation. *J Immunol* 538-541.

**Lefrançois, L. and Puddington, L.** (1995) Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality? *Immunol Today* 16, 16-21.

**Lepage, A.C., Buzoni-Gatel, D., Bout, D.T. and Kasper, L.H.** (1998) Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 161, 4902-4908.

**Levaditi, C., Nicolau, S. and Schoen, R.** (1923) L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *C R Soc Biol Paris* 89, 984-986.

**Liguory, O., David, F., Sarfati, C., Schuitema, A.R., Hartskeerl, R.A., Derouin, F., Modai, J. and Molina, J.M.** (1997) Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* using polymerase chain reaction in stool specimens. *AIDS* 11, 723-726.

**Lin, T., Matsuzaki, G., Kenai, H. and Nomoto, K.** (1994) Progenies of fetal thymocytes are the major source of CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> intestinal intraepithelial lymphocytes early in ontogeny. *Eur J Immunol* 24, 1785-1791.

**Lin, T., Yoshida, H., Matsuzaki, G., Guehler, S.R., Nomoto, K., Barrett, T.A. and Green, D.R.** (1999) Autospecific  $\gamma\delta$  thymocytes that escape negative selection find sanctuary in the intestine. *J Clin Invest* 104, 1297-1305.

**Liu, J.J., Greeley, E.H. and Shadduck, J.A.** (1989) Mechanisms of resistance/susceptibility to murine encephalitozoonosis. *Parasite Immunol* 11, 241-256.

**Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. and Dayer, J.M.** (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391, 344-345.

**Lores, B., Del Aguila, C. and Arias, C.** (2002) *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 941-945.

**Lowman, P.M., Takvorian, P.M. and Cali, A.** (2000) The effects of elevated temperatures and various time-temperature combinations on the development of *Brachiola (Nosema) algerae* N. Comb. in mammalian cell culture. *J Eukaryot Microbiol* 47, 221-234.

**Lugering, N., Kucharzik, T., Gockel, H., Sorg, C., Stoll, R. and Domschke, W.** (1998) Human intestinal epithelial cells down-regulate IL-8 expression in human intestinal microvascular endothelial cells; role of transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1). *Clin Exp Immunol* 114, 377-384.

**Lugering, N., Kucharzik, T., Kraft, M., Winde, G., Sorg, C., Stoll, R. and Domschke, W.** (1999a) Interleukin (IL)-13 and IL-4 are potent inhibitors of IL-8 secretion by human intestinal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 44, 649-655.

**Lugering, N., Kucharzik, T., Maaser, C., Kraft, M. and Domschke, W.** (1999b) Interleukin-15 strongly inhibits interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 production in human colonic epithelial cells. *Immunology* 98, 504-509.

**Lujan, H.D., Conrad, J.T., Clark, C.G., Touz, M.C., Delbac, F., Vivarès, C.P. and Nash, T.E.** (1998) Detection of microsporidia spore-specific antigens by monoclonal antibodies. *Hybridoma* 17, 237-243.

**Lundqvist, C., Melgar, S., Yeung, M.M., Hammarstrom, S. and Hammarstrom, M.L.** (1996) Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J Immunol* 157, 1926-1934.

**Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K. and Lamarre, A.** (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 3, 1021-1035.

**Magaud, A., Achbarou, A. and Desportes-Livage, I.** (1997) Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J Eukaryot Microbiol* 44, 81S.

**Mansfield, K.G., Carville, A., Shvetz, D., Mackey, J., Tzipori, S. and Lackner, A.A.** (1997) Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepatobiliary disease. *Am J Pathol* 150, 1395-1405.

**Margileth, A.M., Strano, A.J., Chandra, R., Neafie, R., Blum, M. and McCully, R.M.** (1973) Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. *Arch Pathol* 95, 145-150.

**Mathis, A.** (2000) Microsporidia : emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int J Parasitol* 30, 795-804.

**Mathis, A., Breitenmoser, A.C. and Deplazes, P.** (1999) Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasite* 6, 189-193.

**Mathis, A., Michel, M., Kuster, H., Muller, C., Weber, R. and Deplazes, P.** (1997) Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology* 114, 29-35.

**Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, T. and Hagiwara, S.** (1959) A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch Pathol* 67, 181-187.

**McDonald, V.** (1999) Gut Intraepithelial Lymphocytes and Immunity to Coccidia. *Parasitol Today* 15, 483-487.

**McDonald, V., Robinson, H.A., Kelly, J.P. and Bancroft, G.J.** (1996) Immunity to *Cryptosporidium muris* infection in mice is expressed through gut CD4<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes. *Infection and Immunity* 64, 2556-2562.

**Mennechet, F.J., Kasper, L.H., Rachinel, N., Li, W., Vandewalle, A. and Buzoni-Gatel, D.** (2002) Lamina propria CD4<sup>+</sup> T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol* 168, 2988-2996.

**Méténier, G. and Vivarès, C.P.** (2001) Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes Infect* 3, 407-415.

**Metge, S., Van Nhieu, J.T., Dahmane, D., Grimbert, P., Foulet, F., Sarfati, C. and Bretagne, S.** (2000) A case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in an HIV-negative renal transplant recipient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 221-223.

**Modigliani, R., Bories, C., Le Charpentier, Y., Salmeron, M., Messing, B., Galian, A., Rambaud, J.C., Lavergne, A., Cochand-Priollet, B. and Desportes, I.** (1985) Diarrhoea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome : a study of four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infestations. *Gut* 26, 179-187.

**Mohindra, A.R., Lee, M.W., Visvesvara, G., Moura, H., Parasuraman, R., Leitch, G.J., Xiao, L., Yee, J. and del Busto, R.** (2002) Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 4, 102-107.

**Molina, J.M., Chastang, C., Goguel, J., Michiels, J.F., Sarfati, C., Desportes-Livage, I., Horton, J., Derouin, F. and Modai, J.** (1998) Albendazole for treatment and prophylaxis of microsporidiosis due to *Encephalitozoon intestinalis* in patients with AIDS: a randomized double-blind controlled trial. *J Infect Dis* 177, 1373-1377.

**Molina, J.M., Goguel, J., Sarfati, C., Michiels, J.F., Desportes-Livage, I., Balkan, S., Chastang, C., Cotte, L., Maslo, C., Struxiano, A., Derouin, F. and Decazes, J.M.** (2000) Trial of



oral fumagillin for the treatment of intestinal microsporidiosis in patients with HIV infection. ANRS 054 Study Group. Agence Nationale de Recherche sur le SIDA. AIDS 14, 1341-1348.

**Molina, J.M., Oksenhendler, E., Beauvais, B., Sarfati, C., Jaccard, A., Derouin, F. and Modai, J.** (1995) Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS : clinical features and response to albendazole therapy. J Infect Dis 171, 245-249.

**Molina, J.M., Tourneur, M., Sarfati, C., Chevret, S., de Gouvello, A., Gobert, J.G., Balkan, S. and Derouin, F.** (2002) Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. N Engl J Med 346, 1963-1969.

**Moretto, M., Casciotti, L., Durell, B. and Khan, I.A.** (2000) Lack of CD4<sup>+</sup> T cells does not affect induction of CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. Infect Immun 68, 6223-6232.

**Moretto, M., Durell, B., Schwartzman, J.D. and Khan, I.A.** (2001)  $\gamma\delta$  T cell-deficient mice have a down-regulated CD8<sup>+</sup> T cell immune response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. J Immunol 166, 7389-7397.

**Moser, B. and Loetscher, P.** (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. Nat Immunol 2, 123-128.

**Mosley, R.L. and Klein, J.R.** (1992) A rapid method for isolating murine intestine intraepithelial lymphocytes with high yield and purity. J Immunol Methods 156, 19-26.

**Müller, M.** (1997) What are the microsporidia ? Parasitol Today 13, 455-456.

**Murdoch, C. and Finn, A.** (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. Blood 95, 3032-3043.

**Murphy, P.M. and Baggiolini, M.** (2000) International union of pharmacology. XIII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev 52, 145-176.

**Nanno, M., Matsumoto, S., Koike, R., Miyasaka, M., Kawaguchi, M., Masuda, T., Miyawaki, S., Cai, Z., Shimamura, T., Fujiura, Y. and et al.** (1994) Development of intestinal intraepithelial T lymphocytes is independent of Peyer's patches and lymph nodes in aly mutant mice. J Immunol 153, 2014-2020.

**Nieder Korn, J.Y., Brieland, J.K. and Mayhew, E.** (1983) Enhanced natural killer cell activity in experimental murine encephalitozoonosis. Infect Immun 41, 302-307.

**Nieder Korn, J.Y. and Shadduck, J.A.** (1980) Role of antibody and complement in the control of *Encephalitozoon cuniculi* infections by rabbit macrophages. Infect Immun 27, 995-1002.

**Nieder Korn, J.Y., Shadduck, J.A. and Weidner, E.** (1980) Antigenic cross-reactivity among different microsporidian spores as determined by immunofluorescence. J Parasitol 66, 675-677.

**Ohteki, T. and MacDonald, H.R.** (1993) Expression of the CD28 costimulatory molecule on subsets of murine intestinal intraepithelial lymphocytes correlates with lineage and responsiveness. Eur J Immunol 23, 1251-1255.

**Ombrouck, C., Ciceron, L., Biligui, S., Brown, S., Marechal, P., van Gool, T., Datry, A., Danis, M. and Desportes-Livage, I.** (1997) Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 35, 652-655.

**Orenstein, J.M., Dieterich, D.T. and Kotler, D.P.** (1992) Systemic dissemination by a newly recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS* 6, 1143-1150.

**Orenstein, J.M., Gaetz, H.P., Yachnis, A.T., Frankel, S.S., Mertens, R.B. and Didier, E.S.** (1997) Disseminated microsporidiosis in AIDS : are any organs spared? *AIDS* 11, 385-386.

**Ouarzane-Amara, M., Franetich, J.F., Mazier, D., Pettit, G.R., Meijer, L., Doerig, C. and Desportes-Livage, I.** (2001) *In Vitro* Activities of Two Antimitotic Compounds, Pancratistatin and 7-Deoxynarciclasine, against *Encephalitozoon intestinalis*, a Microsporidium Causing Infections in Humans. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 3409-3415.

**Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M. and Mathieu, C.** (1999) Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11, 305-312.

**Peyretailade, E., Biderre, C., Peyret, P., Duffieux, F., Metenier, G., Gouy, M., Michot, B. and Vivarès, C.P.** (1998a) Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Res* 26, 3513-3520.

**Peyretailade, E., Broussolle, V., Peyret, P., Metenier, G., Gouy, M. and Vivarès, C.P.** (1998b) Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol Biol Evol* 15, 683-689.

**Peyretailade, E., Peyret, P., Metenier, G. and Vivarès, C.P.** (1999) Isolation of a highly divergent gene encoding CDC2-related protein kinase from *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora). *J Eukaryot Microbiol* 46, 19S-20S.

**Pieniazek, N.J., da Silva, A.J., Slemenda, S.B., Visvesvara, G.S., Kurtti, T.J. and Yasunaga, C.** (1996) *Nosema trichoplusiae* is a synonym of *Nosema bombycis* based on the sequence of the small subunit ribosomal RNA coding region. *J Invertebr Pathol* 67, 316-317.

**Plate, J.M., Lukaszewska, T.L., Bustamante, G. and Hayes, R.L.** (1988) Cytokines involved in the generation of cytolytic effector T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 532, 149-157.

**Porter, B.O. and Malek, T.R.** (1999) IL-2R $\beta$ /IL-7R $\alpha$  doubly deficient mice recapitulate the thymic and intraepithelial lymphocyte (IEL) developmental defects of  $\gamma_c^{-/-}$  mice: roles for both IL-2 and IL-15 in CD8 $\alpha\alpha$  IEL development. *J Immunol* 163, 5906-5912.

**Poussier, P. and Julius, M.** (1994) Thymus-independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Ann Rev Immunol* 12, 521-553.

**Prigneau, O., Achbarou, A., Bouladoux, N., Mazier, D. and Desportes-Livage, I.** (2000) Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidian pathogen of

immunocompromised humans: an immunoblotting and immunocytochemical study. *J Eukaryot Microbiol* 47, 48-56.

**Pulparampil, N., Graham, D., Phalen, D. and Snowden, K.** (1998) *Encephalitozoon hellem* in two eclectus parrots (*Eclectus roratus*): identification from archival tissues. *J Eukaryot Microbiol* 45, 651-655.

**Qin, S., Rottman, J.B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A.E., Moser, B. and Mackay, C.R.** (1998) The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101, 746-754.

**Rabodonirina, M., Bertocchi, M., Desportes-Livage, I., Cotte, L., Levrey, H., Piens, M.A., Monneret, G., Celard, M., Mornex, J.F. and Mojon, M.** (1996) *Enterocytozoon bieneusi* as a cause of chronic diarrhea in a heart-lung transplant recipient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 23, 114-117.

**Raynaud, L., Delbac, F., Broussolle, V., Rabodonirina, M., Girault, V., Wallon, M., Cozon, G., Vivarès, C.P. and Peyron, F.** (1998) Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J Clin Microbiol* 36, 37-40.

**Reetz, J., Rinder, H., Thomschke, A., Manke, H., Schwebs, M. and Bruderek, A.** (2002) First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int J Parasitol* 32, 785-787.

**Regnault, A., Cumano, A., Vassali, P., Guy-Grand, D. and Kourilsky, P.** (1994) Oligoclonal repertoire of the CD8 $\alpha\alpha^+$  and the CD8 $\alpha\beta^+$  TCR $\alpha\beta^+$  murine intestinal intraepithelial T lymphocytes: evidence for the random emergence of T cells. *J Exp Med* 180, 1345-1358.

**Rinder, H., Katzwinkel-Wladarsch, S. and Loscher, T.** (1997) Evidence for the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bieneusi*. *Parasitol Res* 83, 670-672.

**Rinder, H., Thomschke, A., Dengjel, B., Gothe, R., Loscher, T. and Zahler, M.** (2000) Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *J Parasitol* 86, 185-188.

**Roberts, K. and Kilshaw, P.J.** (1993) The mucosal T cell integrin  $\alpha_{M290}\beta_7$  recognizes a ligand on mucosal epithelial cell lines. *Eur J Immunol* 23, 1630-1635.

**Rocha, B., Vassali, P. and Guy-Grand, D.** (1994) Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J Exp Med* 180, 681-686.

**Rollins, B.J.** (1997) Chemokines. *Blood* 90, 909-928.

**Saito, H., Kanamori, Y., Takemori, T., Nariuchi, H., Kubota, E., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T. and Ishikawa, H.** (1998) Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 280, 275-278.

**Salat, J., Braunfuchsova, P. and Kopecky, J.** (2001) Experimental infection of immunocompetent and immunodeficient mice with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 48, 249-254.

**Salat, J., Braunfuchsova, P., Kopecky, J. and Ditrich, O.** (2002) Role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon intestinalis* infection. Parasitol Res 88, 603-608.

**Sallusto, F., Mackay, C.R. and Lanzavecchia, A.** (1997) Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. Science 277, 2005-2007.

**Sanderson, I.R., Ouellette, A.J., Carter, E.A., Walker, W.A. and Hartz, P.R.** (1993) Differential regulation of B7 mRNA in enterocytes and lymphoid cells. Immunology 79, 434-438.

**Sandfort, J., Hannemann, A., Gelderblom, H., Stark, K., Owen, R.L. and Ruf, B.** (1994) *Enterocytozoon bieneusi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 19, 514-516.

**Scharton-Kersten, T.M. and Sher, A.** (1997) Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. Curr Opin Immunol 9, 44-51.

**Schijns, V.E., Haagsma, B.L., Rijke, E.O., Huang, S., Aguet, M. and Horzinek, M.C.** (1994) IFN-gamma receptor-deficient mice generate antiviral Th1-characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. J Immunol 153, 2029-2037.

**Schmidt, E.C. and Shadduck, J.A.** (1983) Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. Infect Immun 40, 936-942.

**Schmidt, E.C. and Shadduck, J.A.** (1984) Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. J Immunol 133, 2712-2719.

**Schmidt, W., Schneider, T., Heise, W., Schulzke, J.D., Weinke, T., Ignatius, R., Owen, R.L., Zeitz, M., Riecken, E.O. and Ullrich, R.** (1997) Mucosal abnormalities in microsporidiosis. AIDS 11, 1589-1594.

**Schon, M.P., Arya, A., Murphy, E.A., Adams, C.M., Strauch, U.G., Agace, W.W., Marsal, J., Donohue, J.P., Her, H., Beier, D.R., Olson, S., Lefrancois, L., Brenner, M.B., Grusby, M.J. and Parker, C.M.** (1999) Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. J Immunol 162, 6641-6649.

**Seydel, K.B., Zhang, T., Champion, G.A., Fichtenbaum, C., Swanson, P.E., Tzipori, S., Griffiths, J.K. and Stanley, S.L., Jr.** (1998) *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal xenografts in SCID mice induces production of human tumor necrosis factor alpha and interleukin-8. Infect Immun 66, 2379-2382.

**Shadduck, J.A., Meccoli, R.A., Davis, R. and Font, R.L.** (1990) Isolation of a microsporidian from a human patient. J Infect Dis 162, 773-776.

**Shah, V., Marino, C. and Altice, F.L.** (1996) Albendazole-induced pseudomembranous colitis. Am J Gastroenterol 91, 1453-1454.

**Shao, L., Serrano, D. and Mayer, L.** (2001) The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. Semin Immunol 13, 163-176.

**Sharpstone, D., Rowbottom, A., Francis, N., Tovey, G., Ellis, D., Barrett, M. and Gazzard, B.** (1997) Thalidomide : a novel therapy for microsporidiosis. *Gastroenterology* 112, 1823-1829.

**Shaw, R.W. and Kent, M.L.** (1999) Fish microsporidia. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. Am Soc Microbiol, Washington, D.C., p. 418-446.

**Silveira, H. and Canning, E.U.** (1995) *Vittaforma corneae* n. comb. for the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *J Eukaryot Microbiol* 42, 158-165.

**Silveira, H., Canning, E.U. and Shadduck, J.A.** (1993) Experimental infection of athymic mice with the human microsporidian *Nosema corneum*. *Parasitology* 107, 489-496.

**Sim, G.-K.** (1995) Intraepithelial lymphocytes and the immune system. *Adv Immunol* 58, 297-343.

**Siveke, J.T. and Hamann, A.** (1998) T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* 160, 550-554.

**Snowden, K., Logan, K. and Didier, E.S.** (1999) *Encephalitozoon cuniculi* strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *J Infect Dis* 180, 2086-2088.

**Snowden, K.F., Didier, E.S., Orenstein, J.M. and Shadduck, J.A.** (1998) Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci* 48, 589-592.

**Snowden, K.F. and Shadduck, J.A.** (1999) Microsporidia of higher vertebrates. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 393-419.

**Sparfel, J.M., Sarfati, C., Liguory, O., Caroff, B., Dumoutier, N., Gueglio, B., Billaud, E., Raffi, F., Molina, J.M., Miegville, M. and Derouin, F.** (1997) Detection of microsporidia and identification of *Enterocytozoon bieneusi* in surface water by filtration followed by specific PCR. *J Eukaryot Microbiol* 44, 78S.

**Sprague, V.** (1974) *Nosema connori* n. sp., a microsporidian parasite of man. *Trans Am Microsc Soc* 93, 400-403.

**Sprague, V.** (1982) Microspora. In: S.P. Parker (Ed) *Synopsis and classification of living organisms*, Vol. 1. McGraw Hill Book Co., New York, N.Y., p. 589-594.

**Sprague, V. and Becnel, J.J.** (1999) Checklist of available generic names for microsporidia with type species and type hosts. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 517-530.

**Sprague, V., Becnel, J.J. and Hazard, E.L.** (1992) Taxonomy of phylum microspora. *Crit Rev Microbiol* 18, 285-395.

**Sprague, V. and Vavra, J.** (1977) Systematics of the microsporidia. In: J. Bulla, L.A. and T.C. Cheng (Eds), *Comparative Pathobiology*, Vol. 1. Plenum Press, New York, p. 1-370.

**Stadnyk, A.W.** (2002) Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 16, 241-246.

**Suzuki, K., Oida, T., Hamada, H., Hitotsumatsu, O., Watanabe, M., Hibi, T., Yamamoto, H., Kubota, E., Kaminogawa, S. and Ishikawa, H.** (2000) Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis. *Immunity* 13, 691-702.

**Swihart, K., Fruth, U., Messmer, N., Hug, K., Behin, R., Huang, S., Del Giudice, G., Aguet, M. and Louis, J.A.** (1995) Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4<sup>+</sup> T cell response. *J Exp Med* 181, 961-971.

**Sydora, B.C., Mixer, P.F., Holcombe, H.R., Eghtesady, P., Williams, K., Amaral, M.C., Nel, A. and Kronenberg, M.** (1993) Intestinal intraepithelial lymphocytes are activated and cytolytic but do not proliferate as well as other T cells in response to mitogenic signals. *J Immunol* 150, 2179-2191.

**Taguchi, T.** (1991) Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3<sup>+</sup>,  $\gamma/\delta$  TCR<sup>+</sup> T cells produce IFN- $\gamma$  and IL-5. *J Immunol* 147, 3736-3744.

**Takvorian, P.M. and Cali, A.** (1994) Enzyme histochemical identification of the Golgi apparatus in the microsporidian, *Glugea stephani*. *J Eukaryot Microbiol* 41, 63S-64S.

**Talal, A.H., Kotler, D.P., Orenstein, J.M. and Weiss, L.M.** (1998) Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in fecal specimens by polymerase chain reaction analysis with primers to the small-subunit rRNA. *Clin Infect Dis* 26, 673-675.

**Tramer, T., Dombrowski, F., Doehring, M., Maier, W.A. and Seitz, H.M.** (1997) Opportunistic properties of *Nosema algerae* (Microspora), a mosquito parasite, in immunocompromised mice. *J Eukaryot Microbiol* 44, 258-262.

**Tumwine, J.K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, D.E., Buckholt, M.A. and Tzipori, S.** (2002) *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 67, 299-303.

**Tzipori, S., Carville, A., Widmer, G., Kotler, D., Mansfield, K. and Lackner, A.** (1997) Transmission and establishment of a persistent infection of *Enterocytozoon bieneusi*, derived from a human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Infect Dis* 175, 1016-1020.

**Undeen, A.H.** (1990) A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa : Microspora) spores. *J Theor Biol* 142, 223-235.

**Undeen, A.H. and Epsky, N.D.** (1990) *In vitro* and *in vivo* germination of *Nosema locustae* (Microsporidia : Nosematidae) spores. *J Invert Pathol* 56, 371-379.

**Undeen, A.H. and Frixione, E.** (1990) The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. *J Protozool* 37, 561-567.

**Undeen, A.H. and Vander Meer, R.K.** (1994) Conversion of intrasporal trehalose into reduction sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista : Microspora) spores : a quantitative study. *J Eukaryot Microbiol* 41, 129-132.

**Undeen, A.H. and Vander Meer, R.K.** (1999) Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol* 73, 294-302.

**Utermohlen, O., Dangel, A., Tarnok, A. and Lehmann-Grube, F.** (1996) Modulation by gamma interferon of antiviral cell-mediated immune responses in vivo. *J Virol* 70, 1521-1526.

**Van de Peer, Y., Ben Ali, A. and Meyer, A.** (2000) Microsporidia : accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene* 246, 1-8.

**van den Broek, M.F., Muller, U., Huang, S., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M.** (1995) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 148, 5-18.

**Van Gool, T., Canning, E.U., Gilis, H., van den Bergh Weerman, M.A., Eeftinck Schattenkerk, J.K. and Dankert, J.** (1994) *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology* 109, 281-289.

**Van Gool, T., Snijders, F., Reiss, P., Eeftinck Schattenkerk, J.K., van der Bergh Weerman, M.A., Bartelsman, J.F., Bruins, J.J., Canning, E.U. and Dankert, J.** (1993) Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infection in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol* 46, 694-699.

**Van Gool, T., Vetter, J.C., Weinmayr, B., Van Dam, A., Derouin, F. and Dankert, J.** (1997) High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J Infect Dis* 175, 1020-1024.

**Vavra, J. and Larsson, J.I.R.** (1999) Structure of the microsporidia. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 7-84.

**Vavra, J., Yachnis, A.T., Shadduck, J.A. and Orenstein, J.M.** (1998) Microsporidia of the genus *Trachipleistophora* - causative agents of human microsporidiosis: description of *Trachipleistophora anthropophthera* n. sp. (Protozoa: Microsporidia). *J Eukaryot Microbiol* 45, 273-283.

**Vidal, K., Grosjean, I., evillard, J.P., Gespach, C. and Kaiserlian, D.** (1993) immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J Immunol Methods* 166, 63-73.

**Viney, J.L., Kilshaw, P.J. and MacDonald, T.T.** (1990) Cytotoxic  $\alpha/\beta^+$  and  $\gamma/\delta^+$  T cells in murine intestinal epithelium. *Eur J Immunol* 20, 1623-1626.

**Visvesvara, G.S.** (2002) *In vitro* cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 15, 401-413.

**Visvesvara, G.S., Belloso, M., Moura, H., Da Silva, A.J., Moura, I.N., Leitch, G.J., Schwartz, D.A., Chevez-Barrrios, P., Wallace, S., Pieniazek, N.J. and Goosey, J.D.** (1999) Isolation of *Nosema algerae* from the cornea of an immunocompetent patient. *J Eukaryot Microbiol* 46, 10S.

**Vivarès, C.P., Gouy, M., Thomarat, F. and Méténier, G.** (2002) Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr Opin Microbiol* 5, 499-505.

- Vivier, E.** (1975) The microsporidia of the protozoa. *Protistologica* 11, 345-361.
- Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B.A. and Woese, C.R.** (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326, 411-414.
- Vossbrinck, C.R. and Woese, C.R.** (1986) Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 320, 287-288.
- Wallace, J.L. and Miller, M.J.** (2000) Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119, 512-520.
- Waller, T., Morein, B. and Fabiansson, E.** (1978) Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 12, 145-148.
- Warhurst, A.C., Hopkins, S.J. and Warhurst, G.** (1998) Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines. *Gut* 42, 208-213.
- Wasson, K. and Peper, R.L.** (2000) Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol* 37, 113-128.
- Weber, R., Bryan, R.T., Owen, R.L., Wilcox, C.M., Gorelkin, L. and Visvesvara, G.S.** (1992a) Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Engl J Med* 326, 161-166.
- Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A. and Owen, R.L.** (1994) Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 7, 426-461.
- Weber, R., Deplazes, P., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., Kuster, H. and Luthy, R.** (1997) Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 336, 474-478.
- Weber, R., Kuster, H., Keller, R., Bachi, T., Spycher, M.A., Briner, J., Russi, E. and Lüthy, R.** (1992b) Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 146, 1603-1605.
- Weber, R., Schwartz, D.A. and Deplazes, P.** (1999) Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., p. 315-362.
- Weidner, E., Byrd, W., Scarbrough, A., Pleshinger, J. and Sibley, D.** (1984) Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle into plasma membrane. *J Protozool* 31, 195-198.
- Weidner, E., Findley, A.M., Dolgikh, V. and Sokolova, J.** (1999) Microsporidian biochemistry and physiology. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), *The microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C.
- Weiss, L.M.** (2000) Molecular phylogeny and diagnostic approaches to microsporidia. In: F. Petry (Ed) *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*, Vol. 6, *Contrib Microbiol*. Karger, Basel, p. 209-235.
- Weiss, L.M.** (2001) Microsporidia : emerging pathogenic protists. *Acta Trop* 78, 89-102.



**Weiss, L.M. and Vossbrinck, C.** (1999) Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In: M. Wittner and L.M. Weiss (Eds), The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C., p. 129-171.

**Weiss, L.M. and Vossbrinck, C.R.** (1998) Microsporidiosis : molecular and diagnostic aspects. *Adv Parasitol* 40, 351-395.

**Weiss, L.M., Zhu, X., Cali, A., Tanowitz, H.B. and Wittner, M.** (1994) Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. *Folia Parasitol* 41, 81-90.

**Wicher, V., Baughn, R.E., Fuentealba, C., Shaddock, J.A., Abbruscato, F. and Wicher, K.** (1991) Enteric infection with an obligate intracellular parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in an experimental model. *Infect Immun* 59, 2225-2231.

**Williams, B.A., Hirt, R.P., Lucocq, J.M. and Embley, T.M.** (2002) A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418, 865-869.

**Wittner, M. and Weiss, L.M.** (1999) The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C.

**Wong, M.M. and Fish, E.N.** (2003) Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 15, 5-14.

**Wright, J.H. and Craighead, E.M.** (1922) Infectious motor paralysis in young rabbits. *J Exp Med* 36, 135-149.

**Yachnis, A.T., Berg, J., Martinez-Salazar, A., Bender, B.S., Diaz, L., Rojiani, A.M., Eskin, T.A. and Orenstein, J.M.** (1996) Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys. Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *Am J Clin Pathol* 106, 535-543.

**Yamamoto, M., Fujihashi, K., Beagley, K.W., McGhee, J.R. and Kiyono, H.** (1993) Cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes. Both  $\gamma/\delta$  T cell receptor-positive and  $\alpha/\beta$  T cell receptor-positive T cells in G1 phase of cell cycle produce IFN-g and IL-5. *J Immunol* 150.

**Yun, C.H., Lillehoj, H.S. and Choi, K.D.** (2000) *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes. *Infect Immun* 68, 1282-1288.

**Zhu, X., Wittner, M., Tanowitz, H.B., Cali, A. and Weiss, L.M.** (1994) Ribosomal RNA sequences of *Enterocytozoon bieneusi*, *Septata intestinalis* and *Ameson michaelis* : phylogenetic construction and structural correspondence. *J Eukaryot Microbiol* 41, 204-209.

**Zierdt, C.H., Gill, V.J. and Zierdt, W.S.** (1993) Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent-antibody assay using whole-cell antisera to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. *J Clin Microbiol* 31, 3071-3074.

**Zlotnik, A. and Yoshie, O.** (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

# *ANNEXES*

**Annexe n°1 :****Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre *Encephalitozoon intestinalis* et *Enterocytozoon bieneusi***

➤ La mise en place d'un traitement curatif efficace des microsporidioses intestinales humaines nécessite l'identification de la microsporidie responsable de la pathologie gastro-intestinale. *Encephalitozoon intestinalis* et *Enterocytozoon bieneusi* présentent en effet une sensibilité différente à l'albendazole et à la fumagilline, seules options thérapeutiques actuellement disponibles pour le traitement des microsporidioses chez l'homme (Franzen et Müller, 1999). La mise au point de méthodes de diagnostic simples et rapides, permettant de détecter et d'identifier spécifiquement les microsporidies dans les échantillons cliniques de patients, a été l'un des principaux axes de la recherche appliquée, développée au laboratoire au cours de ces dernières années.

Dans ce but, nous avons produit une série d'hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux, dirigés spécifiquement contre *E. intestinalis* ou *E. bieneusi* (Achbarou et al., 1999; Prigneau et al., 2000). L'analyse de la réactivité et de la spécificité antigéniques de ces anticorps monoclonaux nous a permis de mettre en évidence deux catégories d'hybridomes : ceux produisant des anticorps reconnaissant des protéines pariétales de la spore (protéines de la paroi) et ceux produisant des anticorps dirigés contre des protéines du tube polaire (Prigneau et al., 2000). Ces anticorps monoclonaux se sont révélés par la suite très intéressants pour l'étude des processus invasifs des microsporidies et le développement de nouvelles stratégies anti-parasitaires.

**Production of immunological probes against *Enterocytozoon  
bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two microsporidian  
species causing intestinal infections in man.**

publié dans *Journal of Eukaryotic Microbiology* (1999), 46(5) : 32S-33S

## Production of Immunological probes Raised against *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two Microsporidian Species Causing Intestinal Infections in Man

ABDERRAHIM ACHBAROU, MARC THELLIER, ISABELLE ACCOCEBERRY, ODILE PRIGNEAU, NICOLAS BOULADOUX, ANNICK DATRY, DOMINIQUE MAZIER and ISABELLE DESPORTES-LIVAGE<sup>1</sup>

*Inserm U 511, Immunobiologie cellulaire et Moléculaire des Infections Parasitaires  
CHU Pitié-Salpêtrière, 91 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris*

The microsporidia most commonly found in humans are *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis* which cause diarrhea and wasting disease in immunocompromized subjects [3]. Other manifestations are also caused by *E. intestinalis* due to its dissemination to the biliary system and liver, kidney, urinary tract, or respiratory tract as well. Transmission electron microscopy and polymerase chain reaction enable the identification of these species in clinical samples. Diagnosis methods using polyclonal or monoclonal antibodies were also proposed [1, 4, 9,11]. To date, no monoclonal antibody (MAb) could be raised against *E. bienewisi*. A series of MAbs were recently produced in our laboratory. Those displaying the best reactivity and the highest specificity are herein described.

### MATERIALS AND METHODS

Femelle BALB/c mice were immunized intraperitoneally with spore extracts of *E. intestinalis* or *E. bienewisi* according to different protocols in order to generate specific monoclonal antibodies. Antigens consisted of either total spores of *E. bienewisi* isolated from infected HIV+ patient stool, or spores of *E. intestinalis* isolated from infected cultures (RK13, THP1) or protein extracts prepared from fractionated *E. intestinalis* spores. Spenocytes of immunized mice were used to produce hybridomas [5]. Hybridoma screening was performed using indirect immunofluorescence assays (IFA) and confocal microscopy, western blotting (WB) and immunolocalization in transmission electron microscopy.

IFAs were performed on isolated spores of *E. intestinalis* or *E. bienewisi* added to 18-well slides, and on RK13 or THP1 culture cells, in LabTek slides fixed at several times post infection with spores of *E. intestinalis*. Antibodies fixation was revealed by incubation with a FITC-coupled goat anti-mouse antibody. Ultrastructural immunolocalisation was analysed on ultrathin sections of isolated spores or of infected RK13 culture fixed and embedded in L-R-White resin. After incubation in hybridoma supernatant or diluted ascitis fluid, 10 nm colloidal gold particles-

coupled goat anti-mouse was used to detect the MAb fixation sites. WB was performed on electrophoretically separated proteins extracted from spores of *E. intestinalis* using SDS-PAGE technic [6] and electrotransfert [11]. The MAbs isotypes were determined with a dipstick isotyping kit (Sigma) according to the intructions enclosed. The cross-reactivity of hybridomas and MAbs with other microsporidian species as with intestinal bacteria, protozoans and fungi as well was assessed by IFA.

### RESULTS AND DISCUSSION

Host cell invasion is mediated by the polar filament (PF), a complex structure ensuring the inoculation of the infectious spore contents into the host cell. Several PF proteins with different molecular weights were described in different species including *E. intestinalis* [1, 2, 5, 8]. In this species, we have identified a 60 kDa protein apparently distinct from other constituents of the PF since it was rather localized as the outer surface of this structure.

Fluorescence and immunolocalisation patterns obtained with different hybridomas and MAbs generated against *E. intestinalis* also demonstrated the complexity of the spore wall. Several proteins were identified, with molecular weights ranged from 18 to 205 kDa. The MAb M<sub>1</sub>6C<sub>1</sub>2C<sub>11</sub> recognized a 125 kDa protein which appeared to be an indicator of the sporogony. The hybridoma M<sub>3</sub>3D<sub>8</sub> and MAb M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>F<sub>7</sub> also detected this protein which was distributed all over the surface of the sporonts, sporoblasts and mature spores, and appeared to be a constituent of the exospore (Fig 1-3). This observation confirms ultrastructural data showing that exospore proteins are secreted from the very beginning of the sporogony. The 125 kDa protein was also detected in the fibrillar network material secreted in the parasitophorous vacuole (PV). Apparently, the exsudation of this material is correlated with the gradual retraction of the sporogonic stages. The diversity of proteins generated during the sporogony is emphasized by the reactivity of the endospore, presporous stages cell membrane and fibrillar network to the hybridoma M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub> that recognized a smear of proteins ranging from 18 to 110 kDa (Prigneau et al. submitted).

Two MAbs, M<sub>2</sub>3B<sub>8</sub>2H<sub>2</sub> (IgM) and M<sub>4</sub>6E<sub>5</sub>2D<sub>9</sub> (IgG) were generated against *E. bienewisi* and appeared to react exclusively with the spore wall of this species.

-----  
<sup>1</sup> To whom correspondance should be addressed  
e-mail: desporte@ext.jussieu.fr

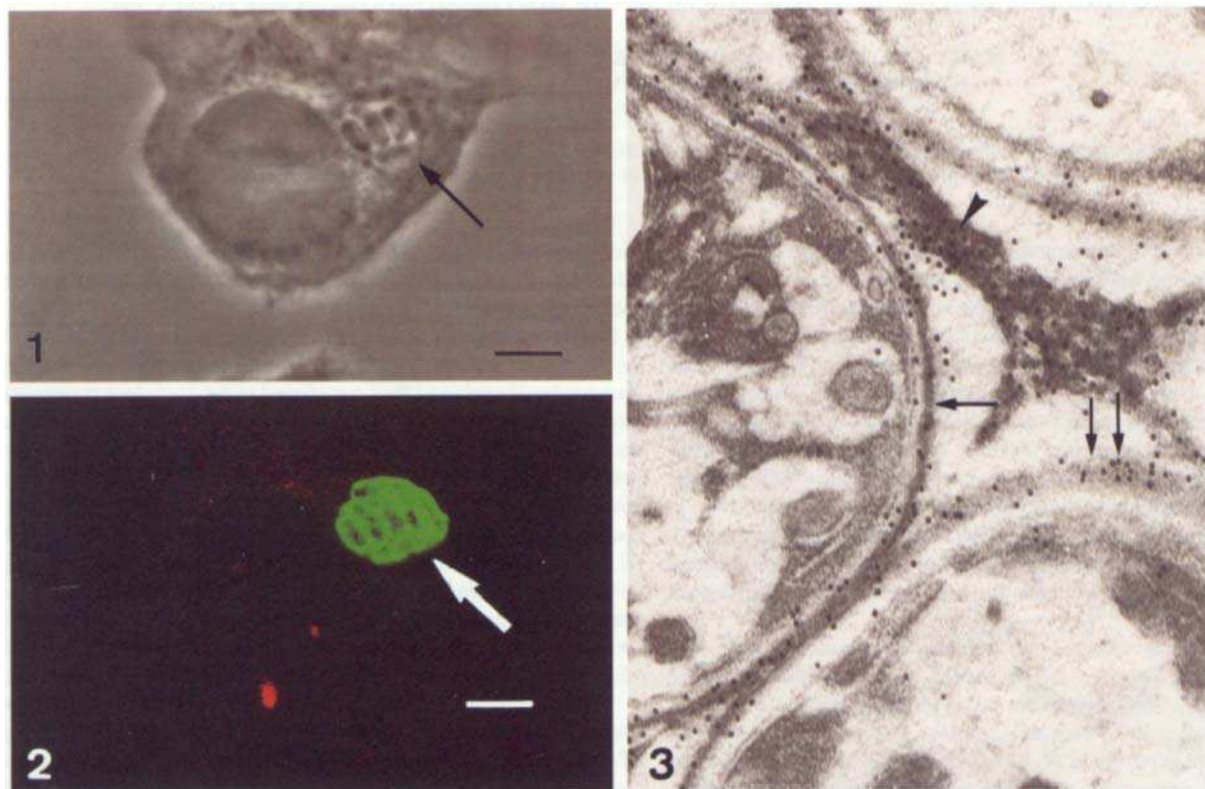


Fig. 1-3. Labelling of *E. intestinalis* with Mab M<sub>1</sub>6C<sub>1</sub>2C<sub>11</sub>. 1. Section of a THP1 cell containing a parasitophorous vacuole (PC) (arrow) in confocal microscopy. 2. Same field showing the IF labelling of the developmental stages of the parasite inside the PV (arrow). Bars = 2,0 µm. 3 TEM immunogold labelling. Gold particles are distributed over the surface of a sporoblast (arrow), mature spores (double arrow) and the septa in the PV. 55,000X

Immunogold electron microscopy confirmed the specificity of both antibodies. No cross-reaction, neither with the spores of the other intestinal species *E. intestinalis* nor with yeast cells, bacteria or any other intestinal parasites was observed. These MAbs were used to identify *E. bienewisi* spores in fecal specimens from unselected patients. The IFA was validated against standard staining methods and polymerase chain reaction. So far, no specific antibodies were produced against *E. bienewisi*. Thus, these MAbs appear to be the first tools enabling the quick identification of this species in fecal specimens (Accoceberry et al. submitted).

The immunological probes produced against both species can be used as new diagnostic tools for clinical investigation. The MAbs raised against *E. intestinalis* are good indicators of the infection in experimental models. They will be also tested for their capacity to inhibit the invasion of host cells.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Study supported in part by a grant of SIDACTION.

#### LITERATURE CITED

1. Beckers P., Derks G., van Gool T., Rietveld F. & Sauerwein R. 1996. *Encephalitozoon intestinalis*-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**: 282-285
2. Delbac F., Duffieux F., David D., Métenier G. & Vivarès C. 1998. Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **45**: 224-231.
3. Desportes-Livage I. 1996. Human microsporidiosis and AIDS: recent advances. *Parasite*, **3**: 107-113.
4. Enriquez F., Ditrich O., Patling J. & Smith K. 1997. Simple diagnosis of *Encephalitozoon* sp. Microsporidian infections using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 724-729.
5. Keohane E. & Weiss L. Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitologica*, **45**: 117-127.
6. Köhler G. & Milstein C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of defined specificity. *Nature*, **256**: 495-497.
7. Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
8. Lujan H., Conrad J., Clark C., Touz M., Delbac F., Vivarès C. & Nash T. 1998. Detection of microsporidia spore-specific antigens by monoclonal antibodies. *Hybridoma*, **17**: 237-243.
9. Ombrouck C., Desportes-Livage I., Achbarou A. & Gentilini M. 1995. Specific detection of the microsporidia *Encephalitozoon intestinalis* in stool samples. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, **319**: 39-43.
10. Towbin A., Staehlin T. & Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.
11. Visvesvara G., da Silva G., Croppo G., Pieniazek N., Leith G., Fergusson D., de Moura H., Wallace S., Slemenda S., Tyrrell I., Moore D. & Meador J. 1995. *In vitro* culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from the urine of a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 930-936.

**Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*,  
a microsporidian pathogen of immunocompromized humans :  
an immunoblotting and immunocytochemical study.**

publié dans *Journal of Eukaryotic Microbiology* (2000), 47(1) : 48-56

# Identification of Proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a Microsporidian Pathogen of Immunocompromised Humans: An Immunoblotting and Immunocytochemical Study

ODILE PRIGNEAU, ABDERRAHIM ACHBAROU, NICOLAS BOULADOUX, DOMINIQUE MAZIER and ISABELLE DESPORTES-LIVAGE

INSERM U 511, Immunobiologie Cellulaire et Moléculaire des Infections Parasitaires, CHU Pitié-Salpêtrière, 91 Bd de l'Hôpital, 75013, Paris, France

**ABSTRACT.** Microsporidia are unicellular and obligate intracellular spore-forming parasites. The spore inoculates the host cell with its non-motile infectious content, the sporoplasm, by way of the polar tube—the typical invasive apparatus of the microsporidian spore. Molecules involved in host cell invasion were investigated in *Encephalitozoon intestinalis*. Mouse polyclonal and monoclonal antibodies were raised against spore proteins and their reactivity was tested by Western-blotting and immunolocalization techniques, including electron and confocal microscopy. The antibodies thus generated could be divided into two major groups. One group reacted to the surface of the parasite at different developmental stages, mostly presporous stages and mature spores, whereas the other group recognized the polar tube. Of the antibodies reacting to the spore wall, one identified an exospore protein at 125 kDa while all others recognized a major doublet at 55–60 kDa, and minor proteins present at the surface of sporogonic stages and in the endospore. All antibodies recognizing spore wall proteins reacted also to the material forming septa in the parasitophorous vacuole. A major polar tube protein at 60 kDa was identified by another group of antibodies.

**Key Words.** Confocal microscopy, *Encephalitozoon intestinalis*, immunogold electron microscopy, microsporidia, polar tube, spore proteins, spore wall, sporogony, Western-blot.

THE microsporidia are unicellular eukaryotic parasites found in a wide range of animals (Canning, Lom, and Hollister 1986). Microsporidian infections have also been reported in man; their pathogenicity in immunocompromised patients with HIV infection has increased the interest in these parasites. Several species, including *Encephalitozoon intestinalis*, were newly identified in AIDS patients (Cali, Kotler and Orenstein 1993; Hartskeerl et al. 1994; Orenstein and Getz 1997; Rayner et al. 1994). Cases of HIV-seronegative and immunocompetent patients with intestinal microsporidiosis were also reported (Desportes-Livage and Bylèn 1998; Enriquez et al. 1998b; Raynaud et al. 1998; van Gool et al. 1997). Recently, *E. intestinalis* has been detected in asymptomatic mammals (Bornay-Llinares et al. 1998). The invasive mechanisms of these parasites are not fully understood. Microsporidia are transmitted by spores that possess a typical extrusion apparatus ensuring the inoculation of the infectious contents into the host cell. Recent ultrastructural observations of macrophages invaded by *E. intestinalis* showed cytological events suggesting that the spore discharge was initiated by the contact between apical part of the spore and the host-cell membrane (Magaud, Achbarou and Desportes-Livage 1997). Such processes leading to a phagocytosis-like mechanism (Docampo and Moreno 1996), are usually mediated by ligand-receptor complexes expressed on both membrane surfaces (Oliver 1996). Our objective is the characterisation of spore proteins involved in the invasion of host cells. The first approach was to produce polyclonal and monoclonal antibodies raised against *E. intestinalis* proteins. Different immunoanalytic techniques were then used to obtain anti-protein markers that could enable the elucidation of invasive mechanisms and the development of new targets for antiparasitic strategy.

## MATERIALS AND METHODS

**Parasites.** *Encephalitozoon intestinalis* spores were collected from monolayers of rabbit kidney cells (RK13) as described by van Gool et al. (1994). Spores were harvested every three days, and suspensions of parasites were centrifuged at 1500 g, for 5 min to eliminate cellular fragments. Sieved spores were then sedimented by centrifugation at 4000 g for 20 min and washed

two times in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Spores were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

**Antigen preparation.** Purified spores ( $1 \times 10^{10}$ ) in 1 ml sterile 0.15 M NaCl were disrupted for 50 s with silicium beads (0.1 and 0.5-mm diam) using a Mini Beadbeater Apparatus® (Bioblock Scientific, Illkirch, France). The suspension was freeze-thawed in liquid nitrogen and then warm water before being placed on ice. The disruption procedure was repeated ten times. The suspension was clarified by a centrifugation at 10,000 g for 10 min and the supernatant was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The quantity of protein (3 mg/ml) was estimated by the method of Bradford (1996).

**Mice immunization and production of polyclonal and monoclonal antibodies (MAbs).** Four to six-week-old BALB/c female mice (Charles Rivers, Saint Aubin-Les-Elbeufs, France) were used for the immunization protocol, preparation of feeder cells for hybridoma culture, and ascites production. Mice were immunized intraperitoneally (IP) with 2 mg of spore proteins emulsified in a 1:1 ratio in Freund's complete adjuvant (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for the first inoculation and in Freund's incomplete adjuvant (Sigma) for the next inoculations. Inoculations were performed at two-week intervals. Sera were collected after each inoculation, screened by indirect immunofluorescence and immunoblot using *E. intestinalis* spores as antigen in order to follow the parasite-specific antibody response. Sera were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and used as positive controls during all immunoassays. Two of the immunized mice were selected and received, three days before fusion protocol, a further intravenous dose of spore proteins emulsified with poly A-poly U (Sigma) as a booster. Spleen cells were fused with SP<sub>2</sub>O myeloma cells in 5:1 ratio as previously described by Köhler and Milstein (1975). Stable hybrids were selected by growth in Dulbecco essential medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing 20% fetal bovine serum (Seromed, Biochrom KG, Berlin), hypoxanthine, aminopterin, and thymidine. Hybridomas producing antibodies (Hab) were screened and selected both by indirect immunofluorescence assay and Western blotting using *E. intestinalis* spores as antigen. Potentially interesting hybridomas were cloned by limited dilution and produced in large quantities in ascites obtained from mice primed with 500  $\mu\text{l}$  of pristane then 10 d later injected with the corresponding clone.

**Immunoglobulin isotyping.** The MAb isotypes were determined with a dipstick isotyping kit (Sigma, ISO1) according to

Corresponding Author: I. Desportes-Livage—Telephone number: 33 (0)1 40 77 81 05; FAX number: 33 (0)1 45 83 88 58; E-mail: desporte@ext.jussieu.fr



the enclosed instructions or in Western blot by using a specific peroxidase coupled goat anti-mouse IgG, IgA or IgM.

**Indirect immunofluorescence (IFA) and confocal microscopy.** IFA was performed either on isolated spores (El Fakhry et al. 1998) or on cell cultures infected with microsporidia. *Encephalitozoon intestinalis* spores from RK13 cell culture supernatants were resuspended in PBS at  $10^9$  spores per ml. After several washes, they were dried on standard 18-well IFA slides (CML, Nemours, France) that were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Slides were prepared by depositing  $2\ \mu\text{l}$  of the spore suspension onto each well of several slides, air-dried, then fixed in cold acetone ( $-20^\circ\text{C}$ ) for 10 min. RK13 cells were grown on glass coverslips in 8-well plates in DMEM, 5% foetal calf serum (FCS), 1% antibiotics (PSA: 100 units/ml penicillin,  $100\ \mu\text{g/ml}$  streptomycin,  $0.25\ \mu\text{g/ml}$  amphotericin B) and 1% glutamine. After 24 or 48 h of infection with *E. intestinalis*, the cells were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde in PBS. Cell permeabilization was performed after washing with PBS by immersion in cold ethanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) for 10 min. Isolated spores or infected RK13 cell cultures were saturated with PBS/5% nonfat dry milk for 15 min, incubated for 30 min or 1 h at room temperature with various dilutions of immunized mice sera, hybridoma supernatant or ascitic fluids diluted in PBS, then for 1 h at room temperature with 1:200 dilution of FITC-conjugated goat anti-mouse IgG, IgA, IgM (Sigma) containing Evans blue as the counterstain. Between each treatment, slides were carefully washed three times in PBS. Slides were mounted with coverslips and buffered glycerol supplemented with n-propylgallate as the mounting fluid. The slides were examined under epifluorescence (Leitz) and confocal microscope (Leica) microscopes.

**Cross-reactivity studies.** The reactivity of the antibodies with spores of other microsporidian species (*Encephalitozoon cucinuli*, *Encephalitozoon hellem*, *Vittaforma corneae*) were assessed by IFA as described above.

**Immunoelectron microscopy.** Infected RK13 cells were fixed at  $4^\circ\text{C}$  with 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde in 0.15 M Na cacodylate buffer, pH 7.2, for 45 min. After centrifugation (3000 g, for 5 min) cells were washed three times each for 10 min in cacodylate buffer with 0.1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . After dehydration in a graded ethanol series (50–100%), the material was embedded in LR WHITE resin (TAAB, Jos é Delville, Saint Germain-en-Laye, France). The ultrathin sections, blocked for 30 min in 1% BSA in PBS, were incubated for 1 h at room temperature with the antibodies diluted in PBS/0.25% BSA. Following six washes at 5 min intervals in 0.25% BSA in PBS, samples were incubated for 1 h with 1:10 dilution of goat anti-mouse IgG and IgM conjugated with 10-nm colloidal gold particles (Sigma) used as the second antibody. In control experiments, sections were incubated with the second antibody alone. After several washes and uranyl acetate and lead citrate staining, preparations were examined with a JEOL JEM 100CX transmission electron microscope.

**SDS-PAGE and Western blotting.** These were performed with proteins extracted from purified *E. intestinalis* spores using a lysis buffer (0.5 M Tris-HCL, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol), boiled for 3 min, and centrifuged at  $10,000\ \text{g}$  for 5 min. Extracts of  $2 \times 10^9$  parasites were loaded on the slab gel and proteins were separated according to the method of Laemmli (1970) using a 4% stacking gel and a 12% resolving acrylamide gel (14-cm wide). The separated polypeptides were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) using a semi-dry system (Twobin, Staehelin, and Gordon 1979). Non-specific binding sites on the membrane, divided into strips, were first blocked in 5% nonfat dry milk (Gloria, Nestlé France, No-

isiel, France) in TBS/Tween (15 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) for 1 h at room temperature. The strips were then incubated for 2 h (room temperature) or 8 h ( $4^\circ\text{C}$ ) with 1:2 dilution of hybridoma culture supernatant or 1:100 dilution of the immunized mice sera or the ascites fluid. After several washes in TBS/Tween, reactive proteins were detected with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (Sigma) diluted 1:3,000 in TBS/2% nonfat dry milk. Antibody-binding sites were detected by peroxidase activity using diaminobenzidine as an enzyme substrate (Dako, Trappes, France).

## RESULTS

One immunized mouse (IP1) raised the highest serum antibody activity against whole *E. intestinalis* spores after the second boost of the immunization and was thus selected for the fusion protocol. The screening of wells containing growing clones was started 10 d after the fusion of spleen cells with SP<sub>2</sub>O myeloma cells. Out of a total of 384 wells, 183 hybridomas were screened by the IFA. According to the fluorescence patterns obtained on isolated spores, the hybridomas could be divided into two major groups. One group reacted to the surface of the parasite at different developmental stages, mostly pre-spore stages and mature spores (Fig. 1–3) whereas the reactivity of the other group was directed against the polar tube (Fig. 5). MABs were generated by limit dilution of the corresponding hybridoma.

### Indirect immunofluorescence and immunogold reactivity.

*Antibodies reacting to the surface of the parasite.* Mab M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> produced a strong and continual labeling of the spore wall (Fig. 1). The immunogold labeling of infected RK13 cells showed that MAB M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> reacted to the surface of different developmental stages contained in parasitophorous vacuoles (PV). Gold particles were distributed on the external layer of the wall (exospore) of mature spores, on the plasma membrane of the sporonts and sporoblasts, and also on the material forming septa in the PV (Fig. 6). MABs M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub> and M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub> indicated a non-homogeneous binding of the spore wall proteins (Fig. 2, 3). The immunogold electron microscopy showed that the reactivity of these MABs was directed against the inner layer of the spore wall, the endospore (Fig. 7, 8). Small clusters of gold particles were also seen along the membrane of the sporoplasm (Fig. 8). Additionally, the plasma membrane of the other sporogonic stages was also labeled with MAB M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub>. MAB M<sub>3</sub>3C<sub>8</sub> and M<sub>3</sub>3D<sub>8</sub> reacted to the surface of developmental stages and a weak labeling of the spore wall and septa was revealed by the immunogold conjugate (data not shown). PAB M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub> presented a double peripheral binding enabling us to clearly distinguish the endospore from the plasma membrane (Fig. 9, 10). This hybridoma also labeled the plasma membrane of other sporogonic stages (Fig. 11).

*Antibodies reacting to the polar tube.* Four hybridoma supernatants M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub>, M<sub>3</sub>3E<sub>8</sub>, M<sub>3</sub>3H<sub>6</sub>, and M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub> reacted selectively to this structure. M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> and M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub> (Fig. 12–15), raised against the polar tube seemed to preferentially localize at the surface of the structure (Fig. 14, 15) where gold particles appeared to be mostly distributed on the outer membrane of the polar tube. Gold particles were not only found on the tube coiled inside the spores but also when it was discharged (Fig. 13). Such a labeling enabled us to follow the progression of the polar tube inside the host cell both in IFA and in TEM. In contrast to *E. intestinalis* antiserum (Fig. 4), MAB M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> reacted exclusively with the polar tube (Fig. 5). Moreover, fluorescence of the polar tube of ungerminated spores could be seen within the spore. In each case, the labeling patterns were much the same and reacted always very strongly, even at a 1:10,000 dilution.

**Cross-reactivity.** HAbs M<sub>3</sub>3D<sub>8</sub>, M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub> or M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub> reactive to

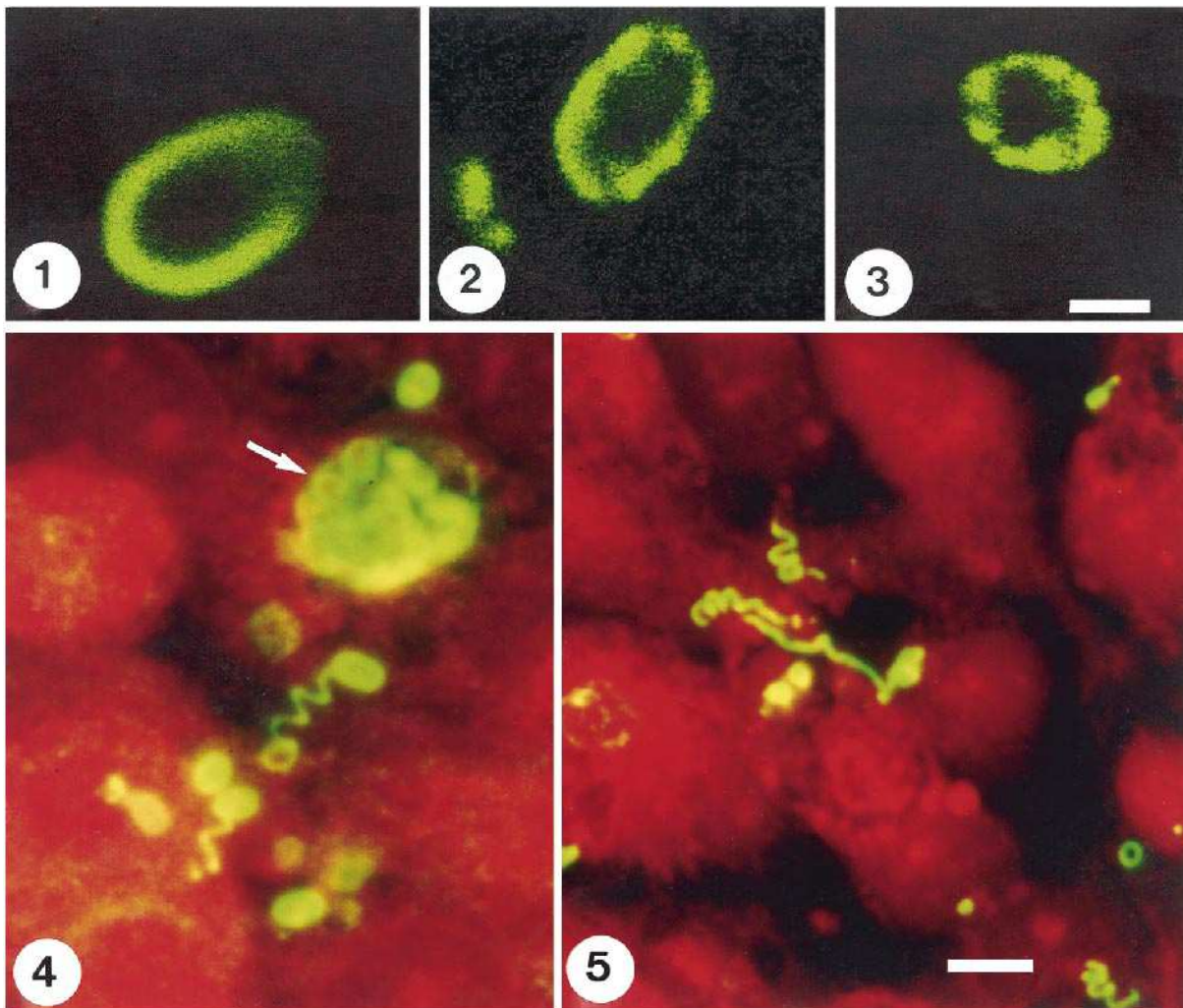


Fig. 1–5. Indirect immunofluorescence reactions using polyclonal and monoclonal antibodies against *Encephalitozoon intestinalis* proteins. **1.** Specific labelling of *E. intestinalis* spore wall with MAb M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>. **2, 3.** A discontinuous labelling of *E. intestinalis* spore wall is obtained with MAb M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub> and MAb M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub>, respectively. Bar = 0.5  $\mu$ m. **4.** Confocal view of RK13 cells (stained with Evans blue) infected with *E. intestinalis*. Labeling with anti-*E. intestinalis* total serum. Parasites, at various stages, inside a parasitophorous vacuole and isolated spores with extruded polar tubes are uniformly stained. **5.** MAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> anti-55–60 kDa clearly stains the extruded polar tube. Bar = 2.0  $\mu$ m.

the plasma membrane and the endospore reacted with *V. corneae* but no significant binding could be observed with the other two species, *E. cuniculi* and *E. hellem*. HAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> and M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub> gave no clear cross-reaction with the other microsporidia, except for *E. cuniculi*, for which the fluorescence of the polar tube was extremely weak (Table 2).

**Reactivity of antibodies to electrophoretically separated protein bands.** Molecular weights were determined in Western blotting by comparison with a molecular weight marker (Gibco) ranging from 10.5 kDa to 205 kDa. Proteins revealed are between 15 kDa and 205 kDa (Table 1 and Fig. 16). Most HAb and MAb were isotyped as IgG and the MAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> raised against the polar tube was more precisely isotyped as IgG1. The MAb M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> raised against an exospore protein also present in presporous stages reacted with a very thin band of 125 kDa molecular weight (Lane 8, Fig. 16 A). A doublet at 55–60 kDa was recognized by other HAb or MAb some of them differing by one or two bands (M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub> and M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub>) (Lanes 6, 7, 11 and 12, Fig. 16 A). The four HAb and the two MAb directed against the polar tube reacted with a broad well-defined band

around 60 kDa (Lanes 4, 9, 10, and 14, Fig. 16 A; lanes 1 and 2, Fig. 16 B).

## DISCUSSION

From sixteen antibody-secreting hybridomas reacting against spores of *E. intestinalis*, five MAb (M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub>, M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub>, M<sub>3</sub>4D<sub>9</sub>, M<sub>3</sub>3C<sub>8</sub>, and M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>) were obtained and expanded in both ascites and culture. For some hybridomas we failed to find the precise localization of the proteins as the labeling was too weak. Nonetheless, the specificity of the binding was systematically confirmed by the absence of gold particles when sections were exclusively treated with the second antibody. All positive reactions reported herein were obtained under reducing conditions. The reactivity of hybridomas M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub>, M<sub>3</sub>3C<sub>7</sub>, M<sub>3</sub>3C<sub>8</sub>, M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>, and M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub> with different stages inside a unique vacuole indicates that common antigens are expressed at the surface of parasites throughout the development. The corresponding proteins ranged in molecular weights from 125 kDa for M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> to 18 kDa for M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub>. Most of the proteins characterized by Western blot were localized either in the spore wall of *E. intestinalis*

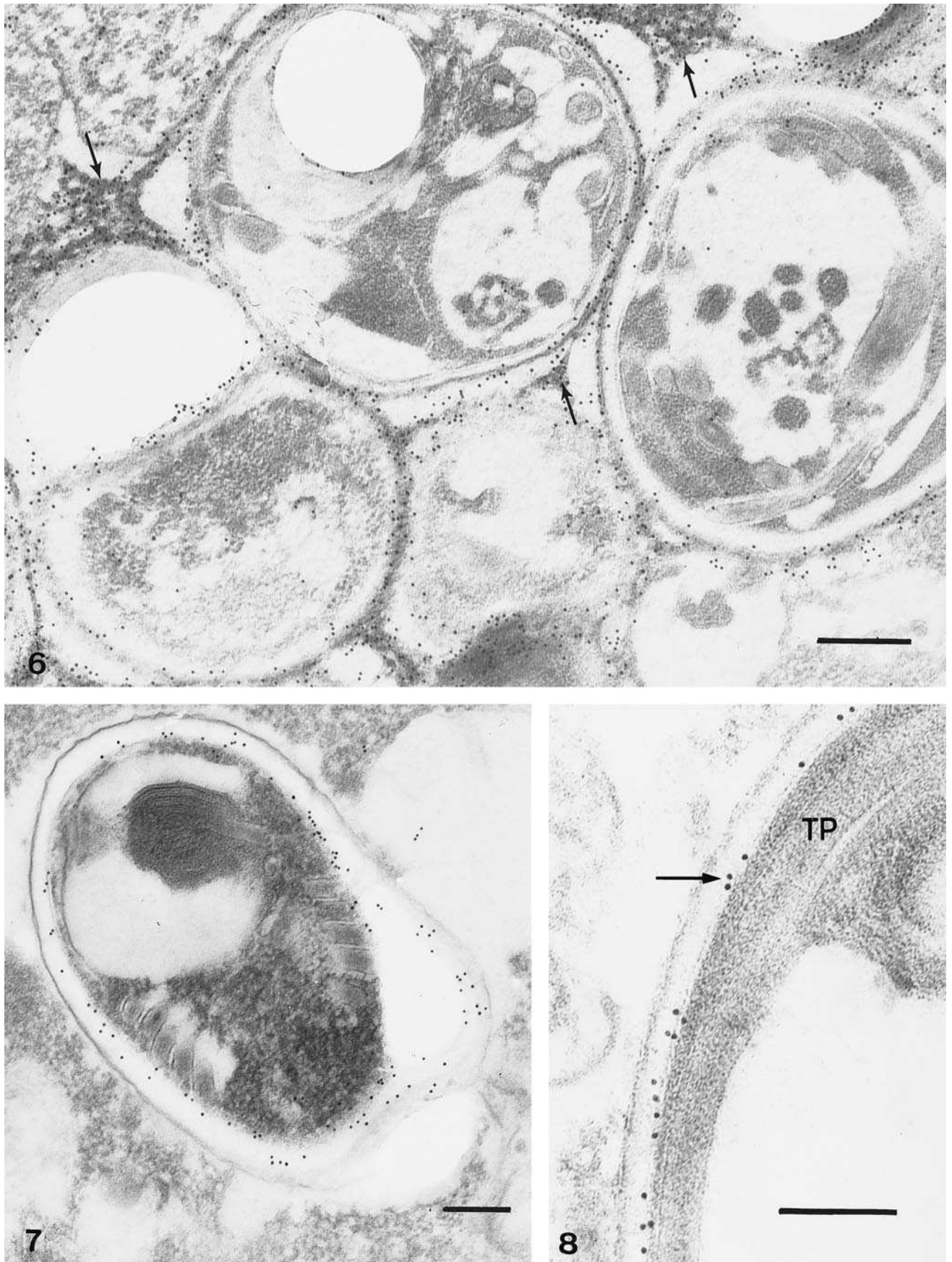


Fig. 6–8. Immunogold electron microscopy of sections of *Encephalitozoon intestinalis* incubated with different antibodies. **6.** MAb M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>: Gold particles labeled a material distributed in the septa (arrows) and all over the surface of the developmental stages present in the parasitophorous vacuole. Bar = 0.3  $\mu$ m. **7.** MAb M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub>: Gold particles labeled endospore. **8.** A discontinuous labeling of the endospore is also obtained with the antibody M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub> (arrow). Most gold particles are deposited along the plasma membrane of the sporoplasm. Bars = 0.2  $\mu$ m.

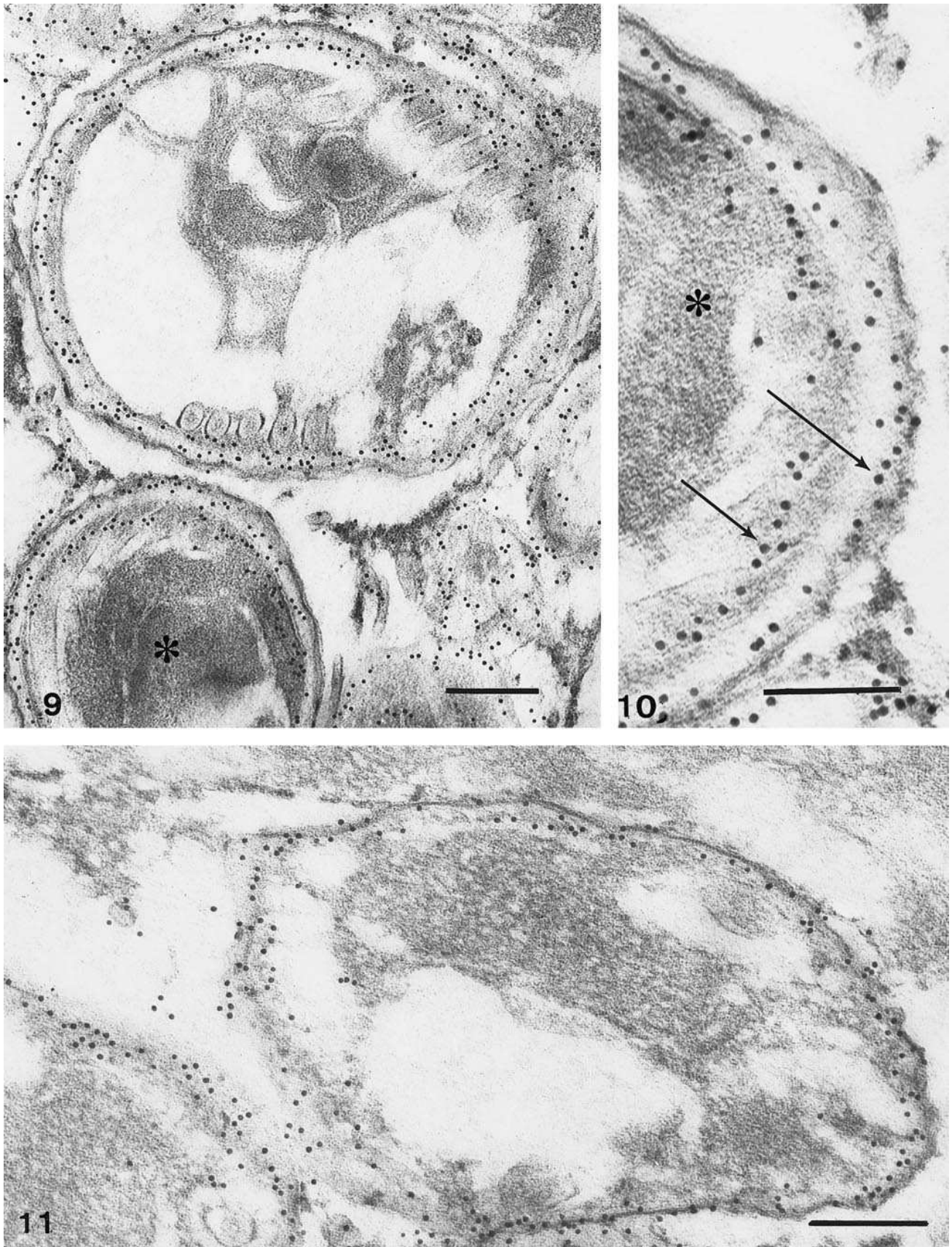


Fig. 9–11. Different stages of *Encephalitozoon intestinalis* are labeled by the HAb M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub>. 9, 10. M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub> labels the plasma membrane and the endospore as shown by the two concentric circles of gold particles observed in mature spores (arrows). 11. A dense labeling of the plasma membrane is observed in presporous stages. Bars = 0.2  $\mu$ m.

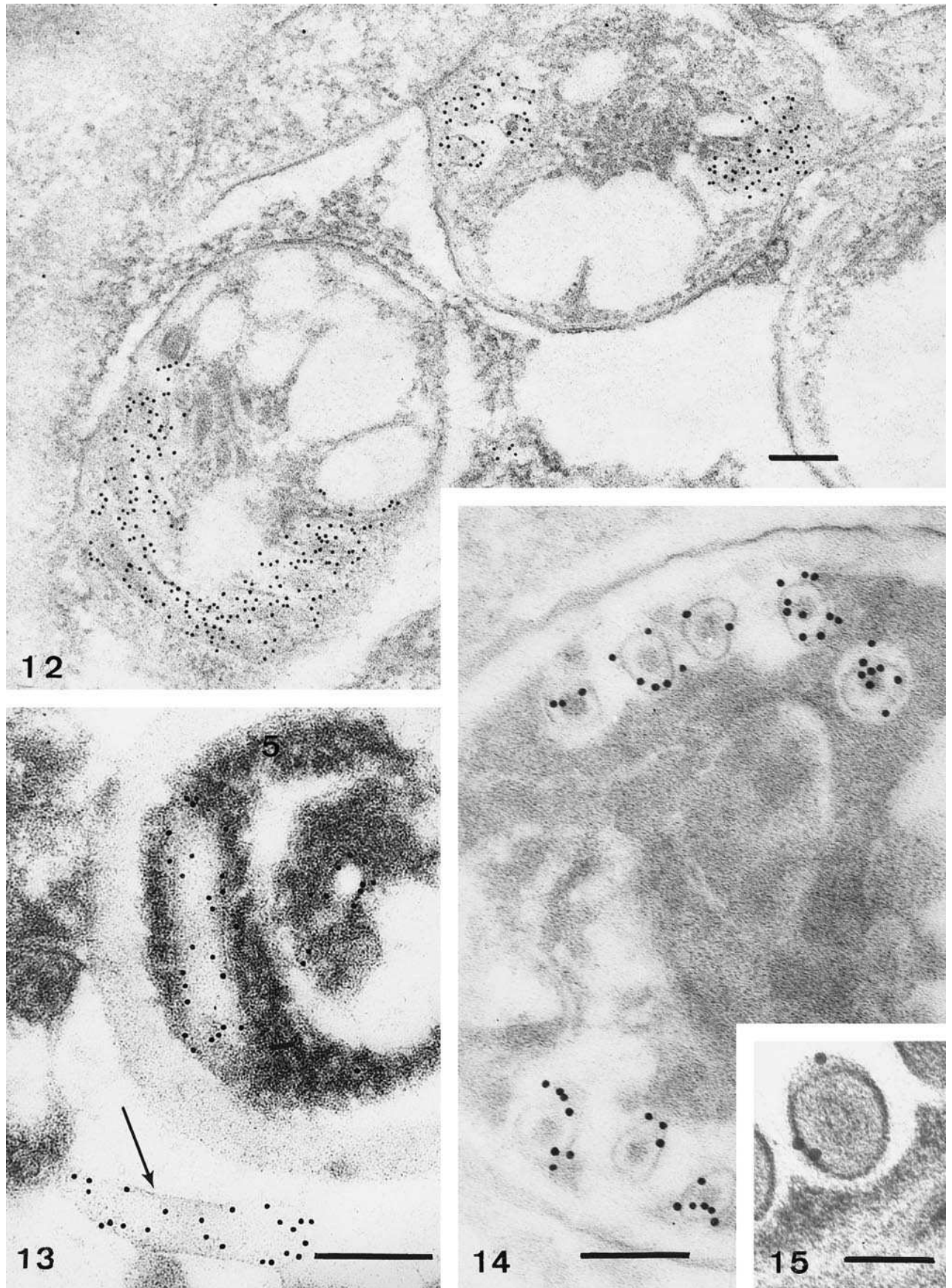


Fig. 12–15. Immunogold labeling of the polar tube of *Encephalitozoon intestinalis* with two monoclonals. 12. MAb  $M_34F_6$ . 13. The binding of the MAb  $M_33B_8$  is specific to both unextruded and extruded (arrow) polar tubes. 14. Labeling of polar tube sections with MAb  $M_33B_8$ . Bars = 0.2  $\mu\text{m}$ . 15. Cortical labeling of the polar tube. Bar = 0.05  $\mu\text{m}$ .

Table 1. Characteristics of antibodies produced against *Encephalitozoon intestinalis*.

Antibody	Indirect immunofluorescence assay	Cell locations	Western-blot (kDa)	Isotype
M <sub>3</sub> 3D <sub>9</sub>	spore wall	sporogonic stages, exospore	125	IgG
M <sub>3</sub> 2E <sub>3</sub>	sporogonic stages	plasma membrane endospore	major doublet at 55–60 minor smear (18–50)	IgG
M <sub>3</sub> 3C <sub>8</sub>	sporogonic stages	spore wall (weak labeling)	major doublet at 55–60 smear (18–50)	IgG1
M <sub>3</sub> 3D <sub>8</sub>	sporogonic stages	no data	major band at 60 kDa minor bands at 20, 24	IgG
M <sub>3</sub> 4D <sub>7</sub>	sporogonic stages	plasma membrane endospore	major doublet at 55–60 minor bands at 50, 48, 22	IgG
M <sub>3</sub> 4D <sub>8</sub>	spore wall	endospore	major band at 55–60 minor bands at 50, 48, 22	IgG
M <sub>3</sub> 3F <sub>10</sub>	spore wall (weak labeling)	no data	60	IgG
M <sub>3</sub> 3B <sub>8</sub>	polar tube	polar tube	60	IgG
M <sub>3</sub> 3H <sub>6</sub>	polar tube	polar tube	60	IgG
M <sub>3</sub> 4F <sub>6</sub>	polar tube	polar tube	60	IgG

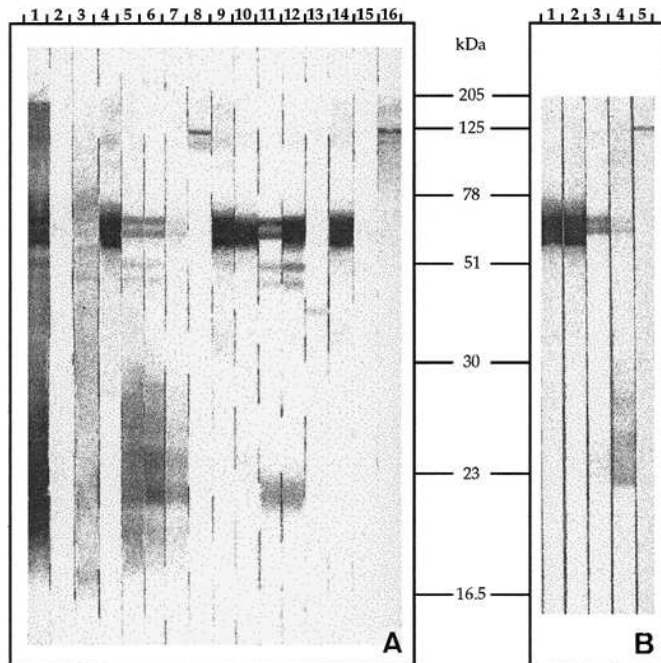


Fig. 16. **A.** Western blot of SDS-PAGE-separated proteins of *Encephalitozoon intestinalis*. Lane 1: Total mouse serum (IP1) diluted 1:100. Lanes 2–15: Reactions of hybridomas. Lane 2—M<sub>3</sub>2F<sub>5</sub>, 3—M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub>, 4—M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub>, lane 5—M<sub>3</sub>3C<sub>8</sub>, 6—M<sub>3</sub>3C<sub>7</sub>, 7—M<sub>3</sub>3D<sub>8</sub>, 8—M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>, 9—M<sub>3</sub>3H<sub>6</sub>, 10—M<sub>3</sub>3F<sub>10</sub>, 11—M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub>, 12—M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub>, 13—M<sub>3</sub>3B<sub>12</sub>, 14—M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub>, 15—M<sub>3</sub>4D<sub>11</sub> (non-diluted supernatants from cultures) respectively, with the blotted spore proteins. Lane 16: control with MAb M<sub>1</sub>,6C<sub>1</sub>,2C<sub>11</sub> (1:100) with a molecular weight of 125 kDa. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons (kDa). Lane 2 and 15 show the background staining of non-reactive hybridomas. Lane 12: The major band at 55–60 kDa corresponds to the doublet recognized by MAb M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub>. **B.** Immunoblotting with anti-*Encephalitozoon intestinalis* monoclonal antibodies. Lane 1—M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub>, 2—M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub>, 3—M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub>, 4—M<sub>3</sub>3C<sub>8</sub>, 5—M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>. MAbs M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> and M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub>, both recognize the polar tube at a molecular weight of 60 kDa (major band); M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub> binds the endospore and a doublet at 55–60 kDa; M<sub>3</sub>3C<sub>8</sub> reacts strongly to the surface of presporogonic stages and a smear of proteins with molecular weights from 20 to 60 kDa; and M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> recognizes the exospore and a band at 125 kDa.

or in the polar tube. These data corroborate those of other studies (Delbac et al. 1998; Lujan et al. 1998).

The different procedures used for the characterization of the MAbs and HABs show a correlation between the IF, immunogold, and Western blot reactivities. The anti-125 kDa MAb M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> uniformly bound to the exospore (Fig. 6). The distribution of gold particles over the surface of all presporogonic stages including the sporonts confirmed that the exospore is secreted at the very beginning of sporogony. Moreover, the detection of the 125 kDa exospore protein in the septa subdividing the PV provides evidence that these structures correspond to a material secreted by the parasite during the sporogony. The reactivity of MAb M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> is similar to that displayed by another MAb (M<sub>1</sub>,6C<sub>1</sub>,2C<sub>11</sub>) produced by our laboratory (Achbarou et al. 1999). The spore wall protein of 130 kDa, identified in *E. intestinalis* by Beckers et al. (1996) could correspond to the protein recognized by M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub> (125 kDa). Indeed, the MAb raised against the 130 kDa protein also reacted with the surfaces of sporogonic stages, including mature spores and sporonts as well (Beckers et al. 1996).

Other MAbs appeared to be reactive with the spore wall. A dotted labeling of the endospore was obtained with MAb M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub> and HAb M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub>. These observations were assessed by both indirect immunofluorescence assay and immunolocalization (Fig. 2, 3, 7, 8). Our results corroborate those of Bigliardi et al. (1996) demonstrating the ultrastructural complexity of the spore wall. Using TEM, freeze-fracture, and deep-etching techniques, they showed that the exospore is a complex of three layers in the microsporidia *E. hellem*. These layers can be seen in the exospore of *E. intestinalis* (Fig. 9, 10). Bigliardi et al. (1996) also demonstrated that the endospore consisted of a fibrous material corresponding to chitin. When analysed in deep-etched, the fibrous content of the endospore revealed a scattered electron-dense content corresponding to different spatial dispositions of the same thick fibrils. The dotted labeling obtained with both HAb M<sub>3</sub>4D<sub>7</sub> and MAb M<sub>3</sub>4D<sub>8</sub> is evocative of the endospore pattern described in *E. hellem* and may correspond to some fibrous constituents. Using IFA, MAbs M<sub>3</sub>3C<sub>8</sub> and M<sub>3</sub>3D<sub>8</sub> appeared to react to different developmental stages except for mature spores, although a weak reactivity to the endospore was revealed by the immunogold conjugate and rare particles were also deposited on a tubular material exudated in the PV (data not shown). The intense reactivity of the endospore and plasma membrane to HAb M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub>, which recognized

Table 2. Indirect immunofluorescence assay cross reactivity of anti-*Encephalitozoon intestinalis* antibodies to other microsporidian species.

Polyclonal	<i>E. intestinalis</i>	<i>E. cuciculi</i>	<i>E. hellem</i>	<i>V. corneae</i>
M <sub>3</sub> 2E <sub>3</sub>	+++	+/-	-	+/-
M <sub>3</sub> 3B <sub>8</sub>	+++	+/-	-	-
M <sub>3</sub> 3C <sub>8</sub>	++	-	-	-
M <sub>3</sub> 3D <sub>9</sub>	++	-	-	+/-
M <sub>3</sub> 3D <sub>9</sub>	+++	-	-	-
M <sub>3</sub> 3H <sub>6</sub>	++	-	-	-
M <sub>3</sub> 3F <sub>10</sub>	+	-	-	-
M <sub>3</sub> 4D <sub>7</sub>	++	-	-	+/-
M <sub>3</sub> 4D <sub>8</sub>	+++	-	-	+/-
M <sub>3</sub> 4F <sub>6</sub>	+++	+/-	-	-

a smear of proteins ranging from 18 and 110 kDa, including the doublet at 55–60 kDa, emphasizes the diversity of proteins forming these structures. This suggests that this antibody recognizes an epitope common to different surface proteins. Such proteins could represent a material secreted during sporogony, since all sporogonic stages were reactive to HAb M<sub>3</sub>2E<sub>3</sub>.

None of our hybridomas reacting with the spore wall displayed evident cross-reactivities with *E. cuciculi*, *E. hellem* or *V. corneae* (Table 2). In contrast Lujan et al. (1998) obtained a series of MAbs, most of them recognizing three proteins at 40, 50, and 60 kDa of the spore wall and sporogonic stages of *E. hellem*, *E. cuciculi*, and *V. corneae*. The higher specificity of the proteins characterized in our study could be responsible for the weaker cross-reactivities generally observed. Moreover, the two anti-*E. intestinalis* MAbs produced by Beckers et al. (1996) did not cross-react with *E. hellem*. Likewise, none of the MAbs recently raised against *E. hellem* reacted with the spores of *E. cuciculi*, *E. intestinalis*, and *Enterocytozoon bineusi* (Croppo et al. 1998). The variations observed in the specificity and the diversity of the Western blot profiles exhibited by the MAbs, even those recognizing the same structures, confirm other studies showing the intraspecific diversity among the spore wall proteins (Deplazes et al. 1996; Didier et al. 1995).

The polar tube protein (PTP) obtained in this work, appears as a strong immunogen as it is revealed in Western blotting by both murine and human sera infected with *E. intestinalis* (Beckers et al. 1996; El Fakhry et al. 1998). Beckers et al. (1996) also obtained a MAb Si91 specific for the polar tube of *E. intestinalis*. That MAb recognized two proteins at 60 and 120 kDa and reacted exclusively with the surface of extruded hollow polar tubes, whereas our MAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> recognized the 60-kDa PTP, whatever its localization, within the spore or outside (Fig. 13). The differences observed in the protein profile and reactivity of MAbs Si91 and M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> could depend on the procedures utilized for the preparation of the antigenic material. The selective reactivity of MAb Si91 also suggests that unique epitopes can be exposed at the surface of everted polar tubes (Keohane and Weiss 1998). Electron microscopy has revealed the complexity of the intrasporal polar tube that consists of concentric layers including the outer sheath, lucent intermediate layer, and inner electron-dense core seen in the cross-sections of intrasporal *E. intestinalis* polar tubes (Fig. 14, 15). The dense core was shown to consist of unpolymerized PTPs, which are incorporated at the tip of the everting tube ensuring its lengthening (Weidner 1982), whereas the lucent layer appeared to contain glycoproteins (Desportes 1976; Vavra 1972). The preferential distribution of gold particles on the outer sheath, inside the spore, and all over the everted portion of apparently empty tubes (Fig. 13) confirms that the 60kDa protein recognized by MAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> is a PTP (Fig. 15). One PTP at 23 kDa and one at 43 kDa were

isolated in *Ameson michaelis* (Weidner 1976; 1982) and *Glugea americanus*, respectively (Keohane et al. 1996). The extraction of three other proteins from polar tubes of *G. americanus* indicated that this structure could consist of different proteins (Keohane et al. 1996). Recently, Keohane et al. (1999) identified PTPs migrating at 45 kDa in *E. intestinalis* and *E. cuciculi* and at 55 kDa in *E. hellem*. Three PTPs at 34, 75, and 170 kDa in *G. atherinae* and four proteins at 28, 35, 55, and 150 kDa in *E. cuciculi* were identified by Delbac et al. (1998) who detected antigenic similarities for the 34 kDa *Glugea* PTP and the 35 kDa *E. cuciculi* PTP. Cross-reactivity was also displayed by proteins of different molecular weights from *G. americanus* (43kDa), *E. intestinalis* and *E. cuciculi* (45 kDa), and *E. hellem* (55 kDa), indicating that they shared common epitopes (Delbac et al. 1996, 1998; Lujan et al. 1998; Schottelius, Lo, and Schmetz 1995). PTPs display similar characteristics of solubility and hydrophobicity, and amino acid analysis demonstrated that these proteins are members of a unique family of proline-rich PTPs (Keohane and Weiss 1998; Keohane et al. 1999). The cross reactivity between *E. intestinalis* and *E. cuciculi* using our newly produced anti-60 kDa MAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> showed that it weakly recognizes the 55 kDa PTP protein identified in *E. cuciculi* (Delbac et al. 1996, 1998). It should be determined whether this 55 kDa PTP corresponds to that of 45 kDa also identified in both species by Keohane et al. 1999; Keohane and Weiss 1998). The possibility that these proteins could differ in some epitopes is suggested by the absence of cross reactivity of the MAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> with any PTP of *E. hellem*. According to Lujan et al. (1998) a polar tube protein of 55 kDa was also recognized by an anti-*E. intestinalis* Mab (isotyped as an IgM), with cross reactivity observed to *E. hellem*, *E. cuciculi*, and *V. corneae*. Apparently, the larger band at 60 kDa recognized by MAb M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> (this study) displayed a different reactivity, which could explain the discrepancies between our results and those of Lujan (1998).

Clearly, different proteins at 60 kDa were recognized by our antibodies. The 60 kDa protein detected by the MAbs reacting exclusively with the polar tube (M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub>, M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub>) formed a unique major band, whereas the 60 kDa protein detected by the HAbs and MAbs reactive to the surface of the parasite (plasma membrane, endospore) appeared to be assembled in a doublet with a 55 kDa protein (Table 1 and Figure 16A, B). For the series of *E. intestinalis* MAbs produced by Lujan et al. (1998), two recognizing a major 55kDa protein reacted to the polar filament and the spore wall, respectively. Both structures were together labeled in spores of *E. cuciculi* treated with the anti-55 kDa generated against this species (Delbac et al. 1998).

Among the panel of antibodies raised against spores of *E. intestinalis*, our MAb M<sub>3</sub>3D<sub>9</sub>, appears to be a good marker of *E. intestinalis*, since it did not cross-react with other species. Moreover, MAbs M<sub>3</sub>3B<sub>8</sub> and M<sub>3</sub>4F<sub>6</sub> specifically labeled the polar tube, which ensures the inoculation of the infectious spore contents into the host cell. Thus, it would be interesting to determine whether these monoclonal antibodies could inhibit the infection by interfering with polar tube function. This approach is suggested by the effects of an anti-exospore MAb on the development of *Encephalitozoon* spp. in vitro (Enriquez et al. 1998a). These authors showed that pre-treatment of spores with this Mab resulted in the reduction of infected cells; likewise a decrease in the number of intracellular spores was observed when the anti-exospore MAb was present in cultures.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Professor Jean-Jacques Hauw for providing TEM and confocal microscopy facilities. We also would like to thank Dr. Tom van Gool for providing the samples tested

for cross reactivity and Christian Nze for his excellent technical assistance in confocal microscopy.

#### LITERATURE CITED

- Achbarou, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Prigneau, O., Bouladoux, N., Detry, A., Mazier, D. & Desportes-Livage, I. 1999. Production of immunological probes raised against *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two microsporidian species causing intestinal infections in man. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46**:32S-33S.
- Beckers, P. J., Derks, G. J., van Gool, T. V., Rietveld, F. J. R. & Sauerwein, R. 1996. *Encephalocytozoon intestinalis*-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**:282-285.
- Bigliardi, E., Selmi, M. G., Lupetti, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M. & Sacchi, L. 1996. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **43**:181-186.
- Bornay-Llinares, F. J., da Silva, A. J., Moura, H., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Cruz-Lopez, Hernandez-Jauregui, P., Guerrero, J. & Enriquez, F. J. 1998. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *J. Infect. Dis.*, **178**:820-826.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248.
- Cali, A., Kotler, D. P. & Orenstein, J. M. 1993. *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **40**:101-112.
- Canning, E. U., Lom, J. & Hollister, J. M. 1986. Microsporidia of Vertebrates. Academic Press, Inc., New York.
- Croppo, G. P., Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., Wallace, S. & Schwartz, D. A. 1998. Identification of the microsporidian *Encephalitozoon hellem* using immunoglobulin G monoclonal antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **122**:182-186.
- Delbac, F., Duffieux, F., David, D., Métenier, G. & Vivarès, C. 1998. Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **45**:224-231.
- Delbac, F., Duffieux, F., Peyret, P., David, D., Métenier, G. & Vivarès, C. P. 1996. Identification of spore proteins in two microsporidian species: an immunoblotting and immunocytochemical study. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **43**:101S.
- 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.
- Desportes, I. 1976. Ultrastructure de *Stempellia mutabilis* L éger & Hesse, microsporidie parasite de l'éphémère *Ephemera vulgata* L. *Protistologica*, **12**:121-150.
- Desportes-Livage, I. & Bylén, E. 1998. Microsporidia infection in HIV-negative subjects. *Acta Protozool.*, **37**:63-70.
- Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Roger, L. B., Bertucci, D. C. & Shadduck, J. A. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* species. *Parasitology*, **111**:411-421.
- Docampo, R. & Moreno, S. N. J. 1996. The role of Ca<sup>2+</sup> in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitology Today*, **12**:61-65.
- El Fakhry, Y., Achbarou, A., Desportes-Livage, I. & Mazier, D. 1998. *Encephalitozoon intestinalis*: humoral responses in interferon-gamma receptor knockout mice infected with a microsporidium pathogenic in AIDS patients. *Exp. Parasitol.*, **89**:113-121.
- Enriquez, F. J., Wagner, G., Fragoso, M. & Ditrich, O. 1998a. Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidian development *in vitro*. *Parasitology*, **117**:515-520.
- Enriquez, F. J., Taren, D., Cruz-Lopez, A., Muramoto, M., Palting, J. D. & Cru, P. 1998b. Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clin. Infect. Dis.*, **26**:1227-1229.
- Hartskeerl, R. A., van Gool, T., Schuitema, A. R. J., Didier, E. S. & Terpstra, W. J. 1994. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology*, **110**:277-285.
- Keohane, E. M. & Weiss, L. M. 1998. Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitologica*, **45**:117-127.
- Keohane, E. M., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., Wittner, M. & Weiss, L. M. 1996. Identification of a microsporidian polar tube protein reactive monoclonal antibody. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **43**:26-31.
- Keohane, E. M., Orr, G. A., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., Wittner, M. & Weiss, L. M. 1999. Polar tube proteins of microsporidia of the family Encephalitozoonidae. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46**:1-5.
- Kölher, G. & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**:495-497.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.
- Lujan, H. D., Conrad, J. T., Clark, C. G., Touz, M. C., Delbac, F., Vivarès, C. P. & Nash, T. E. 1998. Detection of microsporidia spore-specific antigens by monoclonal antibodies. *Hybridoma*, **17**:237-243.
- Magaud, A., Achbarou, A. & Desportes-Livage, I. 1997. Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **44**:81S.
- Oliver, M. 1996. Modulation of host cell intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Parasitology Today*, **12**:145-150.
- Orenstein, J. M. & Gaetz, H. P. 1997. Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared? *AIDS*, **11**:385-386.
- Raynaud, L., Delbac, F., Brousolle, V., Rabodonirina, M., Girault, V., Wallon, M., Cozon, G., Vivarès C. P. & Peyron, F. 1998. Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:37-40.
- Rayner, W., Bryan, R. T., Schwartz, D. A. & Lowen, R. 1994. Microsporidian infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.*, **19**:517-521.
- Schottelius, J., Lo, Y. & Schmetz, C. 1995. *Septata intestinalis* and *Encephalitozoon cuniculi*: cross-reactivity between two microsporidian species. *Folia Parasitol.*, **42**:169-172.
- Twobin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:4350-4354.
- van Gool, T., Canning, E. U., Cilis, H., Weerman, M. A. V. & Eeftink Schattenkerk, J. K. M. 1994. *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology*, **109**:281-289.
- van Gool, T., Vetter, J. C. M., Weimayr, B., Dam, A. V., Derouin, F. & Dankert, J. 1997. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J. Infect. Dis.*, **175**:1020-1024.
- Vavra, J. 1972. Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of the periodic acid-thio-semicarbazide-silver proteinase test. *J. Microscopie*, **14**:357-360.
- Weidner, E. 1976. The microsporidian spore invasion tube. *J. Cell. Biol.*, **71**:23-34.
- Weidner, E. 1982. The Microsporidian invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *J. Cell. Biol.*, **93**:976-979.

Received 05-28-99, 7-2-99, 7-29-99; accepted 8-3-99



**Annexe n°2 :****Effets de composés anti-mitotiques sur la multiplication et le développement d'*Encephalitozoon intestinalis* en culture cellulaire *in vitro***

➤ L'impact des microsporidioses chez les patients atteints du SIDA a fortement régressé dans les pays industrialisés, suite à l'introduction des multi-thérapies anti-rétrovirales permettant la restauration plus ou moins complète d'un statut immunitaire normal (Conteas et *al.*, 1998b; Goguel et *al.*, 1997). Néanmoins, ces infections opportunistes demeurent encore une cause importante de morbidité, voire de mortalité dans les pays en voie de développement (Afrique subsaharienne, Asie), où l'expansion du SIDA se poursuit et où l'accès aux traitements reste très difficile.

Les options thérapeutiques actuellement disponibles pour le traitement des infections microsporidiennes chez les patients infectés par le VIH sont peu nombreuses (Conteas et *al.*, 2000). Seules deux molécules, la fumagilline et l'albendazole, ont montré une certaine efficacité dans le traitement des microsporidioses intestinales, dues respectivement aux espèces *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* (Molina et *al.*, 1998; Molina et *al.*, 2002). Cependant, leur utilisation entraîne souvent des effets secondaires non négligeables et ne permet pas toujours l'éradication complète du parasite, comme en attestent les nombreuses rechutes observées suite à l'arrêt du traitement. Il apparaît donc indispensable de rechercher de nouvelles drogues anti-microsporidiennes plus efficaces et moins toxiques,

capables soit de bloquer le développement ou la multiplication du parasite, soit d'inactiver le pouvoir infectieux des spores microsporidiennes.

Le développement intracellulaire des microsporidies comporte une phase de prolifération (la mérogonie) suivie d'une phase de différenciation (la sporogonie) (Bigliardi et Sacchi, 2001; Desportes-Livage, 2000). L'accomplissement du cycle parasitaire nécessite donc la régulation des processus de division cellulaire et de différenciation. Peu de données sont disponibles concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire chez les microsporidies. Néanmoins, un gène codant pour une protéine kinase apparentée à la protéine CDK1 ("cyclin-dépendant kinase 1") a récemment été cloné chez *Encephalitozoon cuniculi* (Peyretailade et al., 1999) et *Encephalitozoon intestinalis* (Ouarzane-Amara, données personnelles). Les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs sont des protéines connues pour jouer un rôle central dans la régulation de la progression du cycle de division cellulaire chez les organismes eucaryotes supérieurs. Ces enzymes représentent donc des cibles potentiellement intéressantes pour le développement de nouvelles chimiothérapies anti-microsporidiennes.

Partant de cette hypothèse, nous avons réalisé une série de test *in vitro*, afin de cribler une collection de molécules chimiques dérivées d'inhibiteurs connus de CDKs, sur la lignée cellulaire RK13 infectée par la microsporidie *Encephalitozoon intestinalis*. L'effet de chaque composé sur la multiplication du parasite a été évalué par comptage manuel des vacuoles parasitophores, détectées en immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique. Parmi les 526 composés testés, quatre (7-deoxynarciclasine, pancratistatin, lycorin et CRC-985) ont ainsi été sélectionnés en raison de leur pouvoir inhibiteur sur la prolifération d'*Encephalitozoon intestinalis* (Amara et al., 2001; Ouarzane-Amara et al., 2001). L'examen en

microscopie électronique des cultures traitées avec ces 4 molécules, nous a permis d'obtenir des informations supplémentaires concernant d'une part, l'effet de ces inhibiteurs sur le développement du parasite et d'autre part, les éventuelles altérations cytologiques induites sur la cellule hôte. Ces observations ont confirmé que ces 4 molécules perturbent spécifiquement le développement d'*Encephalitozoon intestinalis* sans affecter de façon importante la cellule hôte.

***In vitro* activity of antimitotic compounds against the  
microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*.**

publié dans *Journal of Eukaryotic Microbiology* (2001), Suppl. : 99S-100S

## In vitro Activity of Antimitotic Compounds Against the Microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*

MERYEM OUARZANE AMARA,<sup>a</sup> JEAN-FRANÇOIS FRANETICH,<sup>a</sup> NICOLAS BOULADOUX,<sup>a</sup> DOMINIQUE MAZIER,<sup>a</sup> GERHARD EISENBRAND,<sup>c</sup> DORIS MARKO,<sup>c</sup> LAURENT MEIJER,<sup>b</sup> CHRISTIAN DOERIG,<sup>a</sup> and ISABELLE DESPORTES-LIVAGE<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Inserm U 511, Immunobiologie cellulaire et Moléculaire des Infections Parasitaires, CHU Pitié-Salpêtrière, 91 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris,

<sup>b</sup>CNRS, Station Biologique, 29682 Roscoff cedex, France

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Environmental Toxicology, University of Kaiserslautern, Germany.

Cyclin dependent kinase (CDK) are major players in the progression of the eukaryotic life cycle and inhibition of CDK clearly arrest cell proliferation [6]. These enzymes represent attractive potential targets for antiparasitic chemotherapy [5]. The effect of a collection of antimitotic compounds rich in CDK inhibitors has been tested on a mammalian cell line infected with *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidium causing intestinal and systemic infection in immunocompromized human subjects [4].

### MATERIALS AND METHODS

**Infection and treatment of cell cultures.** Rabbit kidney cells (RK13) were cultivated in Lab-Tek® slides, in RPMI 1640 medium supplemented with 8% heat-inactivated fetal calf serum (56°C for 30 min), streptomycin (100 µg/ml), penicillin (100 U/ml) and L-glutamine (2 mM). Spores from *E. intestinalis* collected from RK13 cells monolayers as described [9] were added to cultured cells at a ratio of 1 spore/10 cells. At the time of infection, different doses of the inhibitors (0.01 to 3 µM) were added to the cultures. After 48 hrs of incubation the cultures were fixed in ethanol at -20°C for 10 min and then incubated for 1 h at 37°C with the monoclonal antibody (MAb) M<sub>1</sub>.6C<sub>1</sub>.2C<sub>11</sub> [1]. This MAb was raised against a surface protein of sporogonic stages, i.e. sporonts, sporoblasts and spores, produced in the parasitophorous vacuoles (PVs) within 24 hrs after infection. PVs containing the parasites were counted in the Lab-Tek® slides using an epifluorescence microscope. The effect of the inhibitors on the morphology of *E. intestinalis* and RK13 cells was examined by electron microscopy

**Determination of IC<sub>50</sub> values on parasite and host cells.** The immunofluorescence assay (IFA) data were plotted and the IC<sub>50</sub> values determined using the Cricket Graph software. Microculture plates (Falcon, 96-well flat bottom) were prepared with RK13 cells. One µCurie of [<sup>3</sup>H] thymidine (5 Ci/mmol) and the appropriate amount of inhibitor was added to each well. Plates were incubated for 48h and [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation was measured with a scintillation counter (BECKMAN). The IC<sub>50</sub> values determined using the Cricket Graph software.

### RESULTS AND DISCUSSION

**Effect of compounds on parasite and host cells.** The effect of 526 inhibitors was evaluated from the number of PVs detected by IFA. We report the effect of two of these molecules: lycorine, an alkaloid isolated from the bulbs of several plants (*Lycoris radiata*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Amaryllis belladonna*) and CRC-985, a staurosporine-ribose conjugate. Both compounds had a good inhibitory effect on parasite development, with IC<sub>50</sub> values of 1.4 µM for lycorine and 0.75 µM for CRC-985 (Fig. 1).

We next measured the effect of the same inhibitors on host cells in a standard [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay. The IC<sub>50</sub> values obtained from the graph (Fig. 2) for the lycorine was around 10 µM, and thus 10 fold higher than parasite IC<sub>50</sub>. For CRC-985, the IC<sub>50</sub> value was 0,70 µM almost identical to that for the parasite (0.75 µM).

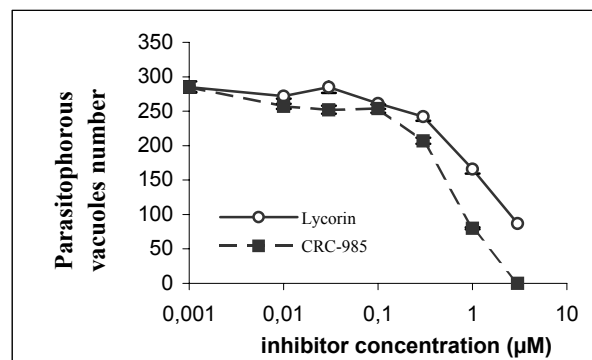


Fig 1 : In vitro effect of lycorin and CRC-985 on parasite development (means ± standard deviations of triplicate culture).

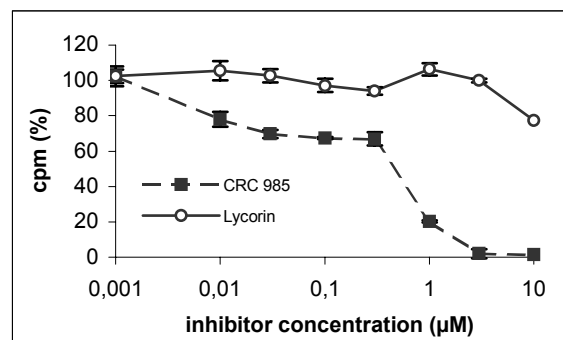


Fig. 2 : In vitro effect of Lycorine and CRC-985 on RK13 cells (means ± standard deviations of triplicate culture).

**Morphological effects of antimitotic compounds.** The gradual resorption of infection caused by the inhibitors in cell cultures was confirmed by transmission electron microscopy. Large PVs containing all developmental stages including numerous spores were seen in cultures treated with the lower doses. At the concentration of 0.5 µM, a reduction in the size of PV was observed, that corresponded to a decrease in the production of sporogonic stages. Curiously some of the spores produced in these vacuoles were larger (up to 4.0 µm) than those of the species usually seen (1.5-2.0 X 1.0-1.2 µm) (Fig. 3A).

Additionally, 8 to 9 coils of the polar tube were numbered in these spores instead of the 6-7 characteristic (Fig. 3B). The dividing meronts seen in these PVs became rounded instead of elongated (Fig. 3A). At a concentration of 1 µM, sporogonic stages were not (or rarely) seen in the PV, whilst meronts were still observed. Some isolated spores were apparently internalized by phagocytosis.

Thus a dose-dependent inhibition of infection occurred in cultures treated with the compounds tested in this study. Both IFA and electron microscopy suggest that the molecules altered the intracellular development of the parasites, especially sporogony. TEM examination of cultures treated with a dose of 1 µM confirmed

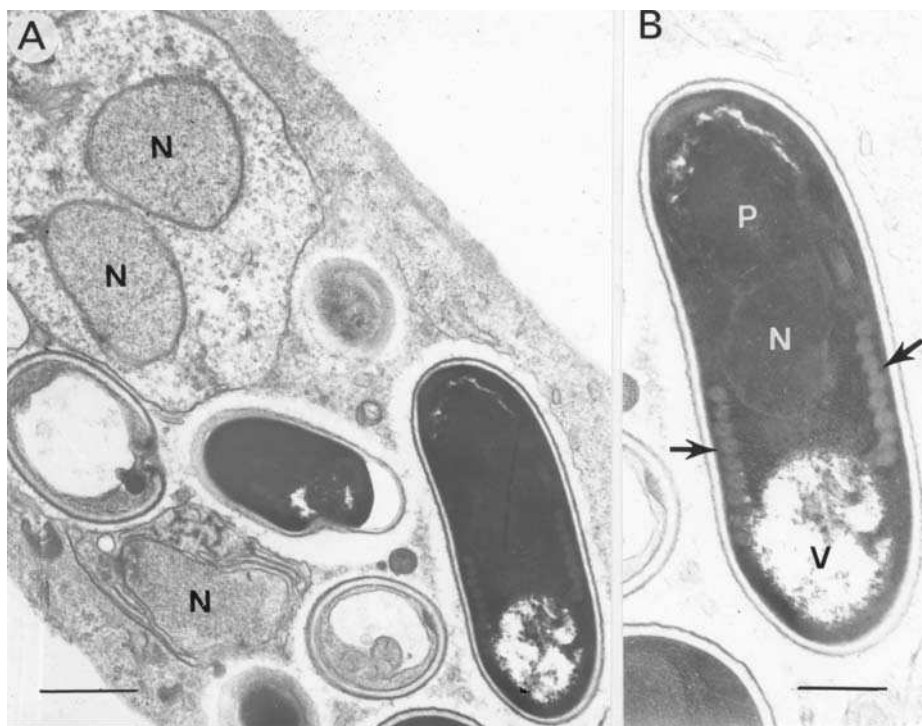


Fig. 3. Transmission electron micrographs showing alterations of parasite development in cultures treated with 0.5  $\mu$ M CRC985. A. Abnormal swelling of a binucleate meront (top), presumably resulting from a dysregulation of cytodieresis. The large electron dense spore measures 4.0 X 2.0  $\mu$ m, instead of 2.0 X 1.0  $\mu$ m as seen in untreated spores. B. Detail showing the 9 coils of the polar tube (arrows) instead of the 6 to 7 observed in the species. N, nucleus; P, polaroplast; V, posterior vacuole. Bars = 0.5  $\mu$ m. Large sporogonic stages were also seen in cultures treated with 0.5  $\mu$ M lycorin.

the drop in the spore production, and also showed the persistence of meronts which were not detected by the MAb directed against a sporogonic stage protein. The correlation between the low number of generated spores and their larger size reflects the reduction of the mitotic activity of sporonts. Likewise, the electron dense nucleus seen in RK13 cells, more especially in those treated with CRC-985 suggests some alteration of their division which could occur after the prophasic condensation of chromosomes.

The decrease in the production of developmental stages and their concomitant enlargement was observed in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* treated with albendazole, an inhibitor of tubulin polymerisation which also alters the mitotic activity of the parasite [3]. Lycorine is chemically related to Pancratistatin and 7-deoxynarciclasin, two antitumoral compounds shown to have antimicrosporidial properties (Ouarzane Amara *et al.*, to be published elsewhere). CRC-985 is related to staurosporine, a compound which inhibits a broad range of protein kinases. Staurosporine inhibits proliferation and causes an abnormal swelling of *Leishmania* promastigotes, without affecting their differentiation to amastigotes, but the mechanism of action of staurosporine is in this case not elucidated [2]. In our study, the similar effects of Lycorine and CRC-985 tend to indicate that the targets of both inhibitors are regulators of the microsporidian cell cycle. A gene encoding a cdc2-related kinase has been isolated in *E. cuniculi* [8] and more recently in *E. intestinalis* (Thellier, Ouarzane-Amara, Doerig, unpublished). The recent classification of microsporidia with the fungi [10] suggests that a single CDK may control progression through the different phases of their cell cycle, as is the case in yeasts [6]. Thus the information reported here points to new potential therapeutic tools which certainly deserve further characterisation, and identifies molecules that may prove promising for investigating microsporidian development.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Study supported by a grant of SIDACTION and PRFMMIP Programme (French Ministry of Research).

#### LITERATURE CITED

1. Achbarou, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Prigneau, O., Bouladoux, N., Detry, A., Mazier, D. & Desportes-Livage, I. 1999. Production of immunological probes raised against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two microsporidian species causing intestinal infections in Man. *J. Euk. Microbiol.*, 46: 32S-33S.
2. Becker, S. & Jaffe, C.L. 1997. Effect of protein kinase inhibitors on the growth, morphology, and infectivity of leishmania promastigotes. *Parasitol. Res.*, 83 : 273-280.
3. Colbourn, N.I., Hollister, W.S., Curry, A. & Canning, E.U. 1994. Activity of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in vitro. *Europ. J. Protistol.* 30: 211-220.
4. Desportes-Livage, I. 2000. Biology of Microsporidia. In: Petry F (ed): Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. Contrib Microbiol. Karger vol. 6: p. 140-160.
5. Doerig, C., Chakrabarti, D., Kappes, B. & Matthews K. 2000. The cell cycle in protozoan parasites. *Progress in cell cycle Research*, 4: 163-183.
6. Lee, M.G. & Nurse, P. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast control gene cdc2. *Nature*, 327:31-55.
7. Meijer L. 1995. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Progress in Cell Cycle Research*, 1: 351-363.
8. Peyretilade, E., Peyret, P., Méténier, G., & Vivarès C.P. 1999. Isolation of a highly divergent gene encoding CDC-2 related protein kinase from *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora). *J. Euk. Microbiol.*, 46:19S-20S.
9. Van Gool, T., Canning, E.U., Gilis, H., Van den Bergh Weerman, M.A., Eeftink Schattenkerk, J.K.M. & Dankert, J. 1994. *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology*, 109: 281-289.
10. Weiss, L.M., Edlind, T.D., Vossbrinck, C.R. & Hashimoto, T. 1999. Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. *J. Euk. Microbiol.*, 46: 17S-18S.

### **Annexe n°3 :**

## **Mise au point d'une nouvelle méthode ELISA pour évaluer la multiplication des microsporidies en culture cellulaire *in vitro***

➤ L'une des principales approches mises en œuvre pour rechercher de nouvelles molécules anti-microsporidiennes, consiste à tester l'effet de différents composés chimiques, potentiellement intéressants, sur le développement et/ou la multiplication des microsporidies. Plusieurs techniques permettent de détecter et de quantifier ces parasites dans une culture cellulaire. Parmi celles-ci, la PCR semi-quantitative et l'immunofluorescence indirecte sont les plus couramment utilisées. Cependant, aucune de ces deux méthodes n'est adaptée au criblage de chimiothèques ("*high-throughput screening*" ou criblage à haut débit) sur des cultures cellulaires parasitées, du fait des contraintes inhérentes à leur utilisation. La PCR nécessite en effet l'extraction de l'ADN parasite, difficilement réalisable à très grande échelle ; tandis que la quantification par immunofluorescence indirecte implique le comptage manuel des parasites en microscopie à fluorescence, et constitue donc une technique fastidieuse, très consommatrice de temps et soumise à l'erreur humaine.

Nous avons donc mis au point une méthode permettant de mesurer de façon simple et rapide la multiplication de la microsporidie *Encephalitozoon intestinalis* en culture cellulaire. Cette nouvelle technique repose sur le principe de l'ELISA et utilise un anticorps monoclonal, l'anticorps M<sub>1.6</sub>C<sub>1.2</sub>C<sub>11</sub>, spécifique d'une protéine présente à la surface des sporontes, des sporoblastes et des spores d'*Encephalitozoon intestinalis* (Achbarou et al., 1999; Prigneau et al.,

2000). A l'issue de sa mise au point, ce test ELISA s'est révélé spécifique, fiable et capable de fournir des résultats reproductibles. De plus, une très bonne corrélation a pu être observée entre les résultats obtenus avec l'ELISA et ceux obtenus avec la technique classique d'immunofluorescence. Cette nouvelle technique semble donc présenter un intérêt tout particulier pour évaluer *in vitro* le potentiel anti-microsporidien de différentes molécules potentiellement intéressantes.



**A new monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay  
to measure *in vitro* multiplication of the microsporidium  
*Encephalitozoon intestinalis*.**

publié dans *Journal of Microbiological Methods* (2003), 53 : 377-385



# A new monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to measure in vitro multiplication of the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*

Nicolas Bouladoux, Sylvestre Biligui, Isabelle Desportes-Livage\*

Inserm U511, Immunobiologie Cellulaire et Moléculaire des Infections Parasitaires, CHU Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'hôpital, 75643 Paris Cedex 13, France

Received 26 September 2002; received in revised form 4 December 2002; accepted 9 December 2002

## Abstract

Microsporidia are obligate intracellular eukaryotic parasites that infect a wide range of hosts, including invertebrates and vertebrates. Microsporidia have emerged as important opportunistic pathogens of humans with the onset of the AIDS pandemic. The potential impact of these infections in human pathology has required the development of antiparasitic strategies, based on the search for molecules having an effect on the development and/or the multiplication of microsporidia. This creates a demand for a simple and reliable in vitro technique for measuring the multiplication of microsporidia. We developed a new monoclonal antibody (MAb) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique and measured the growth of *Encephalitozoon intestinalis* in an in vitro culturing system using this method. The monoclonal antibody is specific for a coat protein of *E. intestinalis* sporogonic stages produced in parasitophorous vacuole. An anti-mouse antibody labeled with peroxidase was used as conjugate. This ELISA is a suitable, specific and semiquantitative technique for measuring the spread of *E. intestinalis*. It is easy to perform and required 5 h from start to end. A good correlation was observed when the ELISA data were compared with the manual microscopic counts of parasitophorous vacuoles obtained after immunofluorescent assay (IFA). Moreover, the ELISA method proved more accurate than the immunofluorescent assay. In summary, the ELISA system described in this study provides a simple reliable assay for measuring the spread of microsporidia in vitro and may prove valuable for the screening of putative interesting antimicrosporidial compounds.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Microsporidia; *Encephalitozoon intestinalis*; ELISA; IFA

## 1. Introduction

Microsporidia are obligate intracellular parasites that infect a wide diversity of hosts, including invertebrates and vertebrates (Desportes-Livage, 2000). While they have been recognized as pathogens in animals for decades, these unicellular parasites have emerged as major opportunistic pathogens of humans

**Abbreviations:** ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HIV, human immunodeficiency virus; IFA, immunofluorescent assay; MAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; PBS–BSA, PBS with 3% bovine serum albumin; PBS–T, PBS with 0.1% Tween 20; PCR, polymerase chain reaction.

\* Corresponding author. Tel.: +33-1-40-77-81-05; fax: +33-1-45-83-88-58.

E-mail address: [desporte@ext.jussieu.fr](mailto:desporte@ext.jussieu.fr) (I. Desportes-Livage).

only since the onset of the AIDS pandemic (Bryan and Schwartz, 1999). To date, several hundred cases of human microsporidiosis have been reported worldwide for human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. Some cases of microsporidiosis have been also described in other immunocompromised individuals, including immunosuppressed transplant recipients (Guerard et al., 1999; Metge et al., 2000). The most frequent clinical manifestations caused by microsporidian parasites in AIDS patients are diarrhea, nausea, malabsorption and weight loss (Kotler and Orenstein, 1998; Franzen and Muller, 2001). Two species are responsible for these symptoms (Coyle et al., 1996). *Enterocytozoon bieneusi* is the most frequently encountered species in AIDS patients and is almost always restricted to the intestinal epithelium (Weber and Bryan, 1994), while the second prevalent species, *Encephalitozoon intestinalis*, readily disseminate to other organs (Orenstein et al., 1997).

*E. bieneusi* has not yet been successfully maintained in long-term culture, but *E. intestinalis* can be readily cultured (Visvesvara, 2002). The life cycle of microsporidia involves a proliferative merogonic phase followed by sporogony, a differentiating phase that results in the production of spores containing a tubular extrusion apparatus (polar tube) for injecting infective spore contents into the host cell (Desportes-Livage, 2000; Bigliardi and Sacchi, 2001). In the case of *Encephalitozoon* microsporidia, these two successive developmental sequences occur in a single parasitophorous vacuole within the host cells.

The therapeutic options for the treatment of microsporidiosis in HIV-infected patients are limited. So far, only albendazole has been successfully used in infections due to *E. intestinalis*, while fumagillin has been recently shown to be effective for eradicating *E. bieneusi* (Molina et al., 1998, 2002). However, incomplete responses and relapses have also been documented for these molecules (Shah et al., 1996; Molina et al., 2002). Rational strategies for the development of other chemotherapeutic agents against microsporidia are based on the search for molecules having an effect on the development and/or the multiplication of the parasite. Model systems developed to test candidate antimicrosporidial agents generally involve assessing an agent's efficacy in reducing or preventing the spread of infection through a monolayer of cultured cells.

Several techniques are available for the detection and the quantification of microsporidia in culture. The most commonly used techniques are semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) and immunofluorescent assay. Semiquantitative PCR is a very sensitive method (Ombrouck et al., 1997; Moretto et al., 2000); however, this technology requires the extraction of parasite DNA and lacks therefore adaptability to high-throughput screening of diverse chemical compounds. Measurement of in vitro multiplication of *E. intestinalis* using immunofluorescent staining implies the manual microscopic counts of parasitophorous vacuoles detected with a monoclonal antibody directed against the sporogonic stages (Amara et al., 2001; Ouarzane-Amara et al., 2001). While this technique is currently used, immunofluorescent assay is not a fully appropriate method for screening candidate antimicrosporidial compounds because microscopic count is time-consuming and subjected to human error. The present study describes an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to quantify the spread of microsporidia in monolayer of cultured cells. This work details the development and the validation of this method and illustrates how it can be applied to assess parasitocidal activity of test molecules. The design of such an ELISA method would facilitate the screening of candidate antimicrosporidial agents.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasite and host cell cultivation

Rabbit kidney cells (RK13, ATCC CCL37) were cultivated in RPMI 1640 supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), amphotericin B (0.75 µg/ml) and 8% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). For maintenance, 8% FCS was replaced with 3% FCS. Medium and all culture supplies were purchased from Gibco (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). *E. intestinalis* spores were used throughout the study. The parasites were maintained by continuous passage in RK13 cells as previously described by Van Gool et al., 1994. Spores of *E. intestinalis* were harvested from the culture medium; suspensions of parasites were centrifuged at  $400 \times g$  for 5 min to remove host cell debris, and spores were then sedimented by centrifugation at  $3000 \times g$  for

20 min. After two washes, spores were resuspended in culture medium, counted with a Malassez slide and used immediately for infection of cultured cells.

## 2.2. Antibodies

The antimicrosporidial monoclonal antibody (MAb) M<sub>1.6C<sub>1.2C<sub>11</sub></sub> is specific for a coat protein of sporogonic stages of *E. intestinalis* generated in the parasitophorous vacuoles (Achbarou et al., 1999; Prigneau et al., 2000). Ascites for MAb M<sub>1.6C<sub>1.2C<sub>11</sub></sub> was produced using BALB/c mice as previously described (Prigneau et al., 2000) and used throughout the studies. The purified MAb E9, a kind gift from Gerd Pluschke (Tropical Institute, Basel, Switzerland), is specific for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* and was used as an irrelevant antiparasitic isotype control antibody.</sub></sub>

## 2.3. ELISA

The 96-well flat-bottom culture plates were seeded with  $1 \times 10^5$  RK13 cells per well in 0.15 ml of culture medium containing 8% FCS, and incubated for 48 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The media were then removed and replaced with 0.15 ml of a suspension of *E. intestinalis* spores (from  $5 \times 10^4$  to  $5 \times 10^6$  spores per well according to the experiment) in culture medium containing 8% FCS. Negative control wells received culture medium without spores, but all reagents were sequentially added to these wells, thereafter. After a 48-h incubation at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, all wells were washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution without sodium bicarbonate, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. Cells were then fixed, perforated with 0.1 ml of 80% acetone for 30 min at room temperature and washed twice with 0.2 ml of PBS using the flick and slam technique. Between all wash steps and at end, residual buffer was removed from wells using the slam technique onto paper towels. Following twice an incubation at room temperature for 15 min with 0.2 ml of PBS containing 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wells were washed three times with PBS and blocked at 37 °C for 30 min with 0.3 ml of PBS containing 3% bovine serum albumin (PBS-BSA). After removal of the blocking buffer, 0.15 ml of the monoclonal antibody M<sub>1.6C<sub>1.2C<sub>11</sub></sub> diluted 1:1000 in sterile PBS-BSA was added to each</sub>

well and the assay plate was incubated for 1 h at 37 °C. Wells were then thoroughly washed with PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS-T) and finally twice with PBS. Peroxidase-labeled goat anti-mouse immunoglobulin G (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was diluted 1:2500 in PBS containing 3% goat serum and 0.15 ml of this labeled secondary antibody was added to each well. After a 1-h incubation at 37 °C, plates were abundantly washed with PBS-T and rinsed twice with PBS. The development reagent solution was prepared by mixing 1 ml of 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) substrate solution with 10 ml of substrate buffer (all from Biorad, Ivry sur Seine, France) and 0.2 ml of this reagent was added to each well. After a 30-min incubation at 37 °C, the reaction was stopped by addition of 50 µl of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and optical density for each well was read at a wavelength of 450 nm using a plate reader (Bio-Tek Instruments). A set of ELISA controls was included in each ELISA plate. The reagent negative control wells received only PBS during the different ELISA steps, while the cell control and the primary antibody control wells were not incubated with the development reagent solution or with the MAb M<sub>1.6C<sub>1.2C<sub>11</sub></sub>, respectively. For each experimental condition (either uninfected cells or infected cells with different amounts of spores), the ELISA assay was performed in 12 test wells, while the different ELISA controls were only represented by four wells. The mean optical density value ± standard deviation was calculated for each group of control and test wells.</sub>

## 2.4. Immunofluorescent assay

Slide eight-well chambers (Lab-Tek®, Nalge Nunc International, Cergy-Pontoise, France) were seeded with  $1 \times 10^5$  RK13 cells per well in culture medium containing 8% FCS; after a 48-h incubation at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, cells were infected with a variable number of *E. intestinalis* spores (ranging from  $5 \times 10^4$  to  $5 \times 10^6$  spores). Negative control wells received only culture medium, but all reagents were sequentially added to these wells, thereafter. At 48-h postinfection, all wells were washed twice with sterile PBS. Cells were fixed for 15 min at -20 °C by incubation with 0.3 ml of absolute methanol, then washed twice with 0.3 ml of PBS and 0.15 ml of the MAb M<sub>1.6C<sub>1.2C<sub>11</sub></sub> diluted 1:500 in sterile PBS was added to all wells. After an</sub>

incubation for 1 h at 37 °C, wells were washed three times with PBS (0.3 ml per well) and incubated for 1 h at 37 °C with 0.15 ml of fluorescein-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (Sigma) diluted 1:500 in PBS containing 1% Evans blue 1:1000. Following three washes with PBS and removal of the slide chambers, the slides were air dried and then mounted in PBS–glycerol (50:50, vol/vol). Parasitophorous vacuoles were then counted manually using an epifluorescence microscope; the entire surface of each well was examined at a magnification of  $\times 500$  and scored for the total number of parasitophorous vacuoles. Each experimental condition is represented by three slide wells; the mean number of parasitophorous vacuoles  $\pm$  standard deviation was calculated for each group.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis of the ELISA and immunofluorescent assay (IFA) data was performed by Student's *t*-test. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviation. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results and discussion

After the injection of infective spore content in the host cell, *Encephalitozoon* microsporidia rapidly enter a stage of intense proliferation and then differentiate to finally give spores (Desportes-Livage, 2000). Parasitophorous vacuoles containing all developmental stages can be therefore detected in infected cells as soon as 24 h after the infection. We decided to develop the ELISA technique using monolayers of *E. intestinalis*-infected RK13 cells at 48-h postinfection. This time point is currently used for the detection of the parasite using immunofluorescent assay. Fig. 1 illustrates the data obtained for one of the first trials to measure multiplication of *E. intestinalis* using the ELISA method. Beside the test wells (lane 4), a set of controls was included in each ELISA plate (lanes 1–3). These controls allowed us to measure not only the background due to the monolayer of RK13 cells (lane 1) but also the absorbance due to the endogenous cellular peroxidase activity (lane 2) and the nonspecific binding of the peroxidase-labeled secondary antibody (lane 3). As shown in Fig. 1 (lane 4), the ELISA

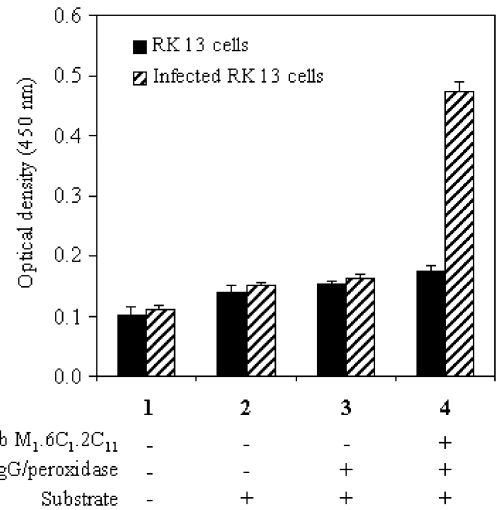


Fig. 1. Measurement of *E. intestinalis* multiplication in cultured RK13 cells by the ELISA method. RK13 cells ( $1 \times 10^5$  per well) seeded in a 96-well flat-bottom culture plate were infected with  $1 \times 10^5$  *E. intestinalis* spores. At 48-h postinfection, the spread of the parasite through the monolayer of RK13 cells was measured using the ELISA method. Optical density at 450 nm was read for each well and the mean optical density value was calculated for each group of wells: reagent negative control wells (lane 1), cell control wells (lane 2), primary antibody control wells (lane 3) and ELISA test wells (lane 4). Bars represent the standard deviations of the group means.

signal of wells containing infected RK13 cells was greater than that obtained with uninfected RK13 cells ( $0.473 \pm 0.016$  compared to  $0.175 \pm 0.009$ ). However, the mean optical density recorded for the uninfected control cells was not only rather high ( $0.175 \pm 0.009$ ) but also quite similar to the mean optical density values recorded for the different ELISA controls (Fig. 1, lanes 1–3). Taken together, these observations demonstrate that the important nonspecific signal obtained for the uninfected cells (Fig. 1, lane 4) results most probably from the endogenous peroxidase activity of RK13 cells and the nonspecific binding of the secondary antibody. Moreover, the mean optical density values obtained for the different ELISA controls were not statistically different between the uninfected RK13 cells and the *E. intestinalis*-infected RK13 cells. The intensity of the nonspecific signal is related to the experimental conditions, like the efficiency of the plate washing or the  $H_2O_2$  treatment for example. The effect of the endogenous peroxidase activity on the ELISA was then examined by performing ELISA without

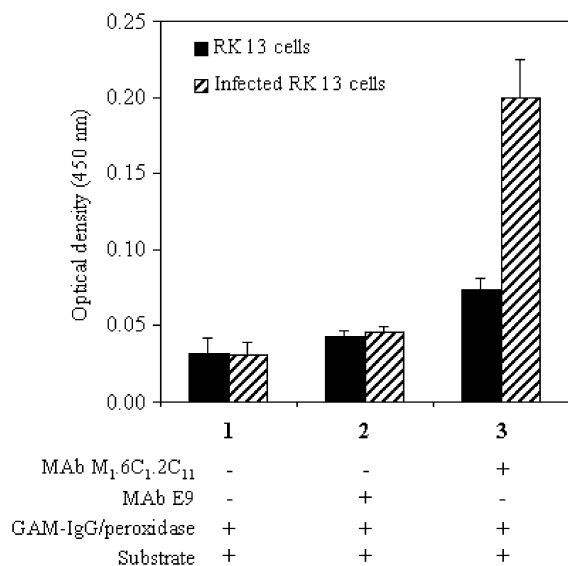


Fig. 2. Specificity of the ELISA system. RK13 cells ( $1 \times 10^5$  per well) seeded in a 96-well flat-bottom culture plate were infected with  $5 \times 10^4$  *E. intestinalis* spores. At 48-h postinfection, the ELISA procedure was carried out to measure the spread of the parasite through the monolayer of RK13 cells using the MAb M<sub>1</sub>.6C<sub>1</sub>.2C<sub>11</sub> (lane 3) or the irrelevant isotype control antibody MAb E9 (lane 2) as primary antibody. Optical density at 450 nm was recorded for each well and the mean optical density value was calculated for each group of wells. Bars represent the standard deviations of the group means.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment used to inhibit the peroxidase activity. In the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the optical density values of all wells were above those recorded with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment during the ELISA procedure, improving the importance of this experimental step to reduce the non-specific signal (data not shown). For the further ELISA experiments, the optical density values measured for each of the different control wells were averaged and subtracted from the test group means to give the adjusted group means for the measurement of parasite multiplication.

The suitability and the accuracy of the ELISA depend upon the specificity of the antibody used to detect the target antigen. The design of the ELISA method was based on the use of the *E. intestinalis*-specific MAb M<sub>1</sub>.6C<sub>1</sub>.2C<sub>11</sub>. This monoclonal antibody detection probe is known to yield high specificity with low background reactivity in immunofluorescent assay. To check the specificity of the primary antibody M<sub>1</sub>.6C<sub>1</sub>.2C<sub>11</sub>, an irrelevant isotype control antibody,

the MAb E9, was used in the ELISA protocol. No statistically significant difference in the mean optical density was then observed between the uninfected cells and the *E. intestinalis*-infected cells (Fig. 2, lane 2). Moreover, the absorbance values recorded with the MAb E9 were similar to the nonspecific signal detected for the primary antibody control wells of the ELISA plate (Fig. 2, lane 1). On the contrary, the signal recorded for the infected cells was higher than those obtained for the uninfected cells when the MAb M<sub>1</sub>.6C<sub>1</sub>.2C<sub>11</sub> was used (Fig. 2, lane 3) as previously observed (Fig. 1). All these observations clearly demonstrate that the ELISA method is a specific suitable means to measure the multiplication of *E. intestinalis*.

Among the experimental sources that contribute to the background signal, nonspecific binding of antibodies was very crucial. The secondary antibody may be an important source of nonspecific signal because of its labeling with the peroxidase. For this reason, we tested different dilutions of the peroxidase-labeled antibody in order to diminish the nonspecific signal

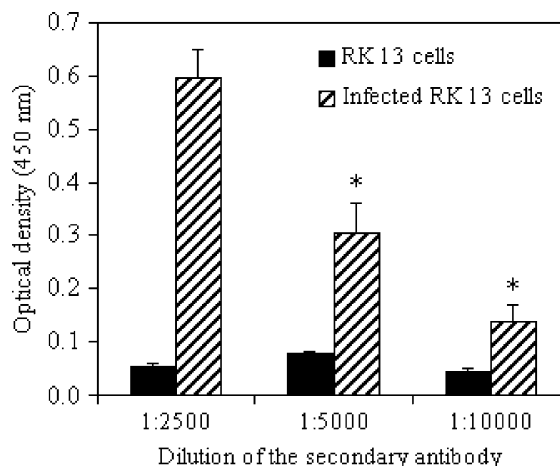


Fig. 3. Dilution of the peroxidase-labeled secondary antibody. RK13 cells ( $1 \times 10^5$  per well) seeded in a 96-well flat-bottom culture plate, were infected with  $5 \times 10^5$  *E. intestinalis* spores. At 48-h postinfection, the spread of the parasite through the monolayer of RK13 cells was measured with the ELISA method using different dilution of the secondary antibody (1:2500, 1:5000, 1:10,000). The mean optical density values (450 nm) were calculated for each group of wells and the data adjusted by subtraction of the different ELISA control data. Bars represent the standard deviations of the group means. Stars (\*) represent the significant difference between the mean ELISA data using the different dilution of the secondary antibody, as determined by Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

level. Fig. 3 shows the effect of the dilution factor of the secondary antibody on the optical density read after the ELISA procedure. The more diluted is the secondary antibody the weaker is the optical density measured for the wells containing infected cells, in contrast with the absorbance recorded for the uninfected negative control wells, for which no effect was observed. The optimal dilution for the secondary antibody is defined as the dilution that yields the most specific absorbance with the weakest nonspecific signal. We therefore chose to use the secondary antibody at 1:2500 dilution with the 1:1000 dilution of the MAb M<sub>1</sub>.6C<sub>1</sub>.2C<sub>11</sub> as experimental conditions for the ELISA procedure.

Having designed the ELISA method, we then studied the validity of this technique. For this pur-

pose, immunofluorescent assays were set up in parallel with ELISA assays for direct comparison. RK13 cells seeded in 96-well plate culture or slide eight-well chambers were simultaneously infected with an increasing number of *E. intestinalis* spores ranging from  $5 \times 10^4$  to  $5 \times 10^6$ . At 48-h postinfection, the spread of parasite was determined by manual counting of parasitophorous vacuoles after immunofluorescent staining (see Materials and methods) and results were compared with those obtained using the ELISA method. Similar results were obtained with both methods as shown in Fig. 4. The number of parasitophorous vacuoles (panel A) and also the optical density values (panel B) increased with the amount of spores used for the infection and a good correlation was observed (see linear regressions in

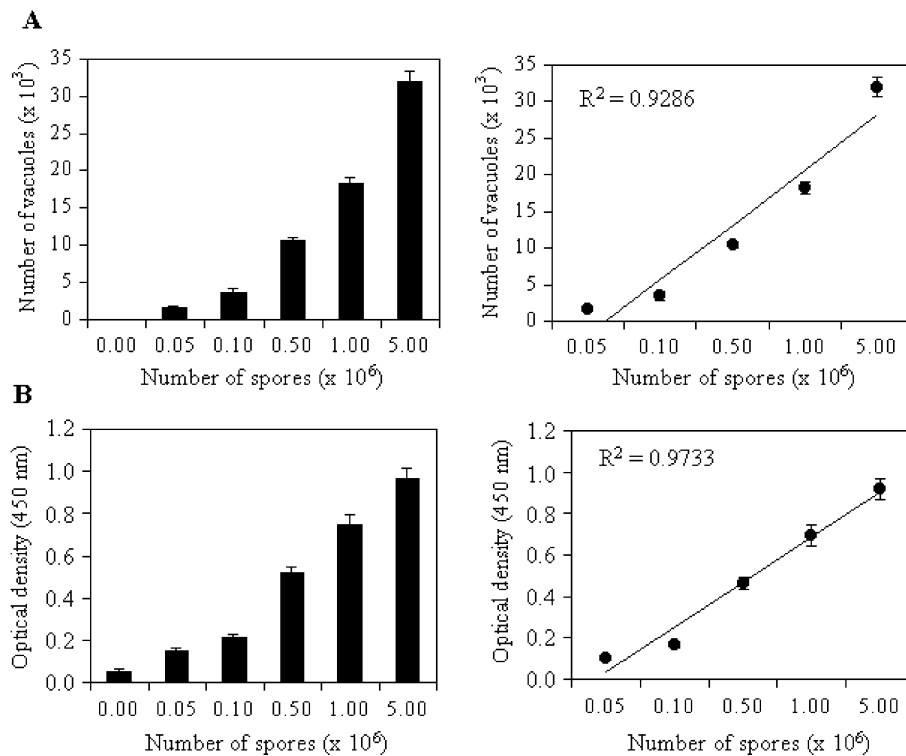


Fig. 4. Comparison of the ELISA method with the immunofluorescent assay. (A) Slide-eight well chambers prepared with RK13 cells ( $1 \times 10^5$  per well) were infected with a number of *E. intestinalis* spores ranging from  $5 \times 10^4$  to  $5 \times 10^6$ . After a 48-h incubation, the number of parasitophorous vacuoles was determined by immunofluorescent assay. The data represent the mean number of parasitophorous vacuoles  $\pm$  standard deviation for each experimental condition. (B) RK13 cells seeded in a 96-well flat bottom culture plate ( $1 \times 10^5$  per well) were infected with a number of *E. intestinalis* spores ranging from  $5 \times 10^4$  to  $5 \times 10^6$ . The multiplication of the parasite was analysed at 48-h post infection using the ELISA method. The mean optical density values (450 nm) were calculated for each group of wells and the data adjusted by subtraction of the different ELISA control data. Bars represent the standard deviations of the group means.

Fig. 4). Additionally, the linear regression between the optical density and the number of spores yielded a better  $R^2$  value than that obtained from the immunofluorescent assay data (0.9733 compared to 0.9286), suggesting that ELISA is more accurate than the

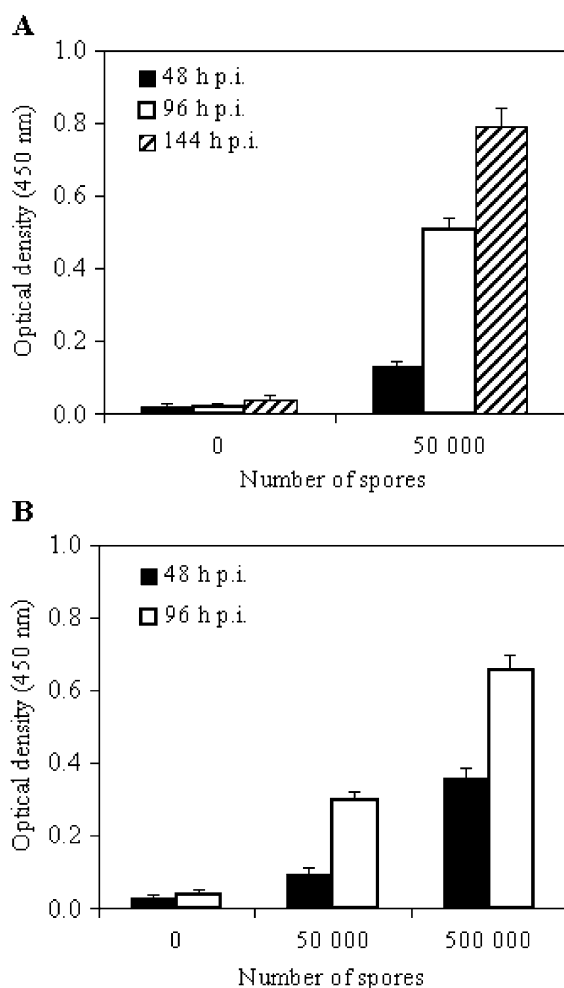


Fig. 5. Kinetics of *E. intestinalis* infection in a monolayer of RK13 cells. (A) Microculture plates prepared with RK13 cells ( $1 \times 10^5$  per well) were infected with  $5 \times 10^4$  *E. intestinalis* spores. Multiplication of the parasite was measured using the ELISA system at 48, 96 and 144 h after the infection. (B) Monolayer of RK13 cells was infected with  $5 \times 10^4$  or  $5 \times 10^5$  spores of *E. intestinalis* and the spread of the infection was assessed at 48- and 96-h postinfection using the ELISA. The mean optical density values (450 nm) were calculated for each group of wells and the data adjusted by subtraction of the different ELISA control data. Bars represent the standard deviations of the group means.

immunofluorescent assay. This better accuracy of the ELISA method could be explained by the fact that it detects theoretically each parasite in the cell, while the immunofluorescent assay evaluates the parasite multiplication by counting parasitophorous vacuoles which are groups of parasites. Taken together, all these results not only fully validate the ELISA method as a reliable means of assessing the multiplication of microsporidia, but also demonstrate that this technique is more accurate than the immunofluorescent assay.

The ELISA technique was developed to facilitate the evaluation of microsporidia spread in an in vitro culturing system. The ELISA was therefore utilized to analyse at different time postinfection the spread of *E. intestinalis* in a monolayer of RK13 cells. For this purpose, RK13 cells were infected with *E. intestinalis* spores and ELISA assays were performed at 48-, 96- and 144-h postinfection. For each time point of these kinetics, a set of standard wells that contained  $1 \times 10^5$  adsorbed *E. intestinalis* spores of the same preparation was treated by the ELISA procedure simultaneously with the test plate. The mean optical density value obtained for these standard wells was used to normalize the ELISA plate results, in order to take account of the interplate variability due to the experimental procedure. As expected, the adjusted mean absorbance for the infected test wells increased with time from  $0.130 \pm 0.013$  at 48 h after the infection to  $0.508 \pm 0.031$  and  $0.792 \pm 0.049$  at 96- and 144-h postinfection, in contrast with that of the uninfected negative control wells that remain very low (Fig. 5, panel A). Likewise, the ELISA signals observed for the infected wells at 96-h postinfection were higher than those recorded at 48 h, and increased with the number of spores used for the infection (Fig. 5, panel B). All these results confirm the interest and the efficacy of the ELISA method.

#### 4. Conclusions

We have developed and further validated an ELISA method as a means of assessing the in vitro multiplication of microsporidia. The value of this method comes from its antibody-based specificity and it provides a significant improvement on time-consuming immunofluorescent assay and costly semi-



quantitative PCR methods. This ELISA system is easy to perform and required 5 h from start to end. The ELISA is also a reliable and accurate technique for which the reproducibility is quite good with little or moderate variability in the optical density values recorded in separate experiments. The optical density values obtained with this technique only constitute semiquantitative data about the spread of the parasite, because the number of parasites was not determined. However, this method allows to compare the multiplication of microsporidia in various experimental conditions and is therefore very attractive. Further applications of the ELISA method include assessing the efficacy of a wide range of drugs against human microsporidia species. This highly versatile method will greatly facilitate the evaluation of antimicrosporidial effects of putative interesting compounds and has the potential to be used for high sample throughput, since the use of 96-well tissue culture plates permits experiments to be carried out on replicate cultures over a wide range of concentrations. Indeed, by this method, we have confirmed previous findings on the activities of two antimetabolic compounds against *E. intestinalis* (Ouarzane-Amara et al., 2001) and recently tested various chemical analogues of these molecules (data not shown, to be published elsewhere). In summary, the ELISA system described herein provides a simple reliable assay for measuring the spread of microsporidia in vitro and may prove valuable for the screening of candidate antimicrosporidial agents.

### Acknowledgements

We are grateful to Gerd Pluschke (Tropical Institute, Basel, Switzerland) for providing the MA b E9. We thank Mireille Lafage for the helpful advice about the design of the ELISA system and Claire Ploton for technical assistance. We also thank Dr. C. Vaquero and Dr. M. Lafon for critical review of the manuscript.

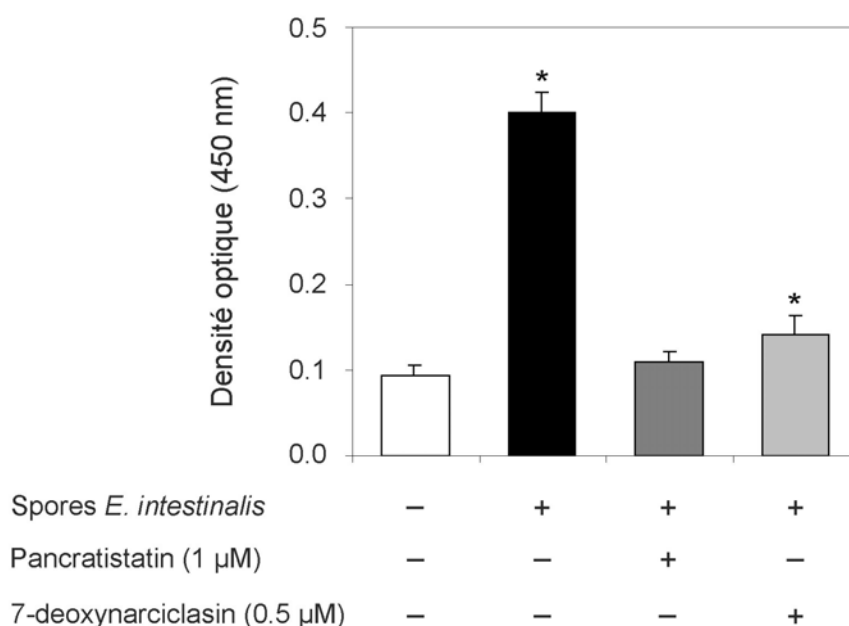
### References

- Archbarou, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Prigneau, O., Bouladoux, N., Datry, A., Mazier, D., Desportes-Livage, I., 1999. Production of immunological probes raised against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two microsporidian species causing intestinal infections in man. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 32S–33S.
- Amara, M.O., Franetich, J.F., Bouladoux, N., Mazier, D., Eisenbrand, G., Marko, D., Meijer, L., Doerig, C., Desportes-Livage, I., 2001. In vitro activity of antimetabolic compounds against the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J. Eukaryot. Microbiol., Suppl.*, 99S–100S.
- Bigliardi, E., Sacchi, L., 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect.* 3, 373–379.
- Bryan, R.T., Schwartz, D.A., 1999. Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC, pp. 502–516.
- Coyle, C.M., Wittner, M., Kotler, D.P., Noyer, C., Orenstein, J.M., Tanowitz, H.B., Weiss, L.M., 1996. Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clin. Infect. Dis.* 23, 1002–1006.
- Desportes-Livage, I., 2000. Biology of microsporidia. *Contrib. Microbiol.* 6, 140–165.
- Franzen, C., Muller, A., 2001. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* 3, 389–400.
- Guerard, A., Rabodonirina, M., Cotte, L., Liguory, O., Piens, M.A., Daoud, S., Picot, S., Touraine, J.L., 1999. Intestinal microsporidiosis occurring in two renal transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Transplantation* 68, 699–707.
- Kotler, D.P., Orenstein, J.M., 1998. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv. Parasitol.* 40, 321–349.
- Metge, S., Van Nhieu, J.T., Dahmane, D., Grimbert, P., Foulet, F., Sarfati, C., Bretagne, S., 2000. A case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in an HIV-negative renal transplant recipient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 221–223.
- Molina, J.M., Chastang, C., Goguel, J., Michiels, J.F., Sarfati, C., Desportes-Livage, I., Horton, J., Derouin, F., Modai, J., 1998. Albendazole for treatment and prophylaxis of microsporidiosis due to *Encephalitozoon intestinalis* in patients with AIDS: a randomized double-blind controlled trial. *J. Infect. Dis.* 177, 1373–1377.
- Molina, J.M., Tourneur, M., Sarfati, C., Chevret, S., de Gouvello, A., Gobert, J.G., Balkan, S., Derouin, F., 2002. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 346, 1963–1969.
- Moretto, M., Casciotti, L., Durell, B., Khan, I.A., 2000. Lack of CD4<sup>+</sup> T cells does not affect induction of CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect. Immun.* 68, 6223–6232.
- Ombrouck, C., Ciceron, L., Biligui, S., Brown, S., Marechal, P., van Gool, T., Datry, A., Danis, M., Desportes-Livage, I., 1997. Specific PCR assay for direct detection of intestinal microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* in fecal specimens from human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 35, 652–655.
- Orenstein, J.M., Gaetz, H.P., Yachnis, A.T., Frankel, S.S., Mertens, R.B., Didier, E.S., 1997. Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared? *AIDS* 11, 385–386.

- Ouarzane-Amara, M., Franetich, J.F., Mazier, D., Pettit, G.R., Meijer, L., Doerig, C., Desportes-Livage, I., 2001. In vitro activities of two antimitotic compounds, pancratistatin and 7-deoxynarciclasine, against *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidium causing infections in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3409–3415.
- Prigneau, O., Achbarou, A., Bouladoux, N., Mazier, D., Desportes-Livage, I., 2000. Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidian pathogen of immunocompromised humans: an immunoblotting and immunocytochemical study. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 48–56.
- Shah, V., Marino, C., Altice, F.L., 1996. Albendazole-induced pseudomembranous colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 91, 1453–1454.
- Van Gool, T., Canning, E.U., Gilis, H., van den Bergh Weerman, M.A., Eeftinck Schattenkerk, J.K., Dankert, J., 1994. *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. *Parasitology* 109, 281–289.
- Visvesvara, G.S., 2002. In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 401–413.
- Weber, R., Bryan, R.T., 1994. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 19, 517–521.

### ► Données complémentaires

Pour confirmer la validité de notre méthode ELISA, nous avons utilisé cette technique afin d'évaluer l'effet anti-parasitaire de deux molécules, la pancratistatin et la 7-deoxynarciclasine, sur des cultures de cellules RK13 infectées avec la microsporidie *E. intestinalis*.



**FIGURE 24: Evaluation de l'effet anti-microsporidien de deux composés anti-mitotiques à l'aide de la méthode ELISA.** Des cellules RK13 mises en culture dans une plaque 96 puits ( $1 \times 10^5$  par puits) sont infectées avec des spores d'*E. intestinalis* et simultanément traitées avec la pancratistatin (1  $\mu$ M) ou la 7-deoxynarciclasine (0,5  $\mu$ M). Au bout de 48 h d'incubation à 37°C, la multiplication du parasite a été évaluée à l'aide de la méthode ELISA et la valeur moyenne  $\pm$  écart type de la densité optique à 450 nm calculée pour chaque groupe de puits. Les étoiles (\*) reflètent une différence significative (test *t* de Student,  $p < 0,05$ ) par rapport à la densité optique moyenne des puits témoins (cellules RK13 non infectées et non traitées).

Des tests *in vitro* réalisés antérieurement ont permis de montrer que ces deux composés anti-mitotiques inhibent spécifiquement la prolifération d'*E. intestinalis* en culture

cellulaire. Le nombre de vacuoles parasitophores, détectées en immunofluorescence indirecte, est en effet fortement réduit dans les cultures de cellules RK13 infectées, traitées pendant 48 h avec l'une de ces deux molécules, par rapport aux cultures infectées non traitées (Ouarzane-Amara et *al.*, 2001). De plus cet effet est dose-dépendant. Des résultats tout à fait similaires sont obtenus en utilisant la technique ELISA (Figure 24), confirmant la possibilité d'utiliser cette méthode pour cribler des chimiothèques sur des cultures de cellules parasitées par les microsporidies.