

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

\*\*\*\*\*

ANNEE 2011-2012

THESE N°

DEVELOPPEMENT D'UNE PCR CONVENTIONNELLE POUR LE  
GENOTYPAGE DE *BLASTOCYSTIS* SPP. DANS LES SELLES :  
APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE ET CLINICO-BIOLOGIQUE PAR UNE  
ETUDE PROSPECTIVE AU CHU DE BORDEAUX

THESE  
POUR LE DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
Obtenu après soutenance du

MEMOIRE  
Du diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement

le 8 Décembre 2011

par

**Bénédicte HERMINEAUD**

née le 19 Mai 1982 à Royan

Examineurs de la thèse

M. le Professeur Gilles DREYFUSS.....Président  
Mme. le Professeur Sylvie ROGEZ.....Juge  
Mme. le Professeur Marie-Laure DARDE.....Juge  
M. le Docteur Thierry PISTONE.....Membre invité  
Mme. le Docteur Mahussi D'ALMEIDA-FOURQUET.....Directeur de Thèse



UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

\*\*\*\*\*

ANNEE 2011-2012

THESE N°

DEVELOPPEMENT D'UNE PCR CONVENTIONNELLE POUR LE  
GENOTYPAGE DE *BLASTOCYSTIS* SPP. DANS LES SELLES :  
APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE ET CLINICO-BIOLOGIQUE PAR UNE  
ETUDE PROSPECTIVE AU CHU DE BORDEAUX

THESE  
POUR LE DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
Obtenu après soutenance du

MEMOIRE  
Du diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Présentée et soutenue publiquement

le 8 Décembre 2011

par

**Bénédicte HERMINEAUD**

née le 19 Mai 1982 à Royan

Examineurs de la thèse

M. le Professeur Gilles DREYFUSS.....Président  
Mme. le Professeur Sylvie ROGEZ.....Juge  
Mme. le Professeur Marie-Laure DARDE.....Juge  
M. le Docteur Thierry PISTONE.....Membre invité  
Mme. le Docteur Mahussi D'ALMEIDA-FOURQUET.....Directeur de Thèse

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

### DOYEN DE LA FACULTE

### VICE-DOYEN

Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

### VICE-DOYEN

Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

### PROFESSEURS :

**BENEYTOUT** Jean-Louis

**BOTINEAU** Michel

**BROSSARD** Claude

**BUXERAUD** Jacques

**CARDOT** Philippe

**CHULIA** Albert

**CHULIA** Dominique

**DELAGE** Christiane

**DESMOULIERE** Alexis

**DREYFUSS** Gilles

**DUROUX** Jean-Luc

**LOUDART** Nicole

BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

PHARMACOTECHNIE

CHIMIE ORGANIQUE, CHIMIE

THERAPEUTIQUE

CHIMIE ANALYTIQUE

PHARMACOGNOSIE

PHARMACOTECHNIE

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

PHYSIOLOGIE

MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE,

IMMUNOLOGIE

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES,

INFORMATIQUE

PHARMACODYNAMIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

**LACHATRE** Gérard

**MOESCH** Christian

**ROGEZ** Sylvie

TOXICOLOGIE

HYGIENE, HYDROLOGIE, ENVIRONNEMENT

MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE,

IMMUNOLOGIE

### MAITRES DE CONFERENCES :

**BALSY** Philippe

**BATTU** Serge

**BEAUBRUN-GIRY** Karine

**BILLET** Fabrice

**CALLISTE** Claude

**CLEDAT** Dominique

**COMBY** Francis

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE, BROMATOLOGIE

PHARMACOTECHNIE

PHYSIOLOGIE

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES,

INFORMATIQUE

CHIMIE ANALYTIQUE, BROMATOLOGIE

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE



|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>COURTIOUX</b> Bertrand       | PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE                   |
| <b>DELABASSEE</b> Sylvie        | MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE,<br>IMMUNOLOGIE   |
| <b>DEMIOT</b> Claire Elise      | PHARMACOLOGIE                                  |
| <b>FAGNERE</b> Catherine        | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE              |
| <b>FROISSARD</b> Didier         | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE                     |
| <b>JAMBUT</b> Anne-Catherine    | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE              |
| <b>LABROUSSE</b> Pascal         | BOTANIQUE, CRYPTOLOGAMIE                       |
| <b>LEGER</b> David              | BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE                |
| <b>LIAGRE</b> Bernard           | BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE                |
| <b>LOTFI</b> Hayat              | TOXICOLOGIE                                    |
| <b>MARION-THORE</b> Sandrine    | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE              |
| <b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE              |
| <b>MILLOT</b> Marion            | PHARMACOGNOSIE                                 |
| <b>MOREAU</b> Jeanne            | MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE,<br>IMMUNOLOGIE   |
| <b>POUGET</b> Christelle        | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE              |
| <b>ROUSSEAU</b> Annick          | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES,<br>INFORMATIQUE |
| <b>SIMON</b> Alain              | CHIMIE GENERALE ET MINERALE                    |
| <b>TROUILLAS</b> Patrick        | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES,<br>INFORMATIQUE |
| <b>VIANA</b> Marylène           | PHARMACOTECHNIE                                |
| <b>VIGNOLES</b> Philippe        | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES,<br>INFORMATIQUE |

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS  
HOSPITALIERS  
DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>DREYFUSS</b> Marie-Françoise | CHIMIE ANALYTIQUE, BROMATOLOGIE<br>PROFESSEUR CERTIFIE |
| <b>MARBOUTY</b> Jean-Michel     | ANGLAIS  |

# REMERCIEMENTS

Au Président de ce Jury,

M. le Professeur Gilles DREYFUSS,

C'est un honneur de vous avoir comme Président de Jury. Je vous exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance pour votre soutien et votre implication si sincère dans cette soutenance.

Aux Professeurs de l'Université de Limoges,

Mme. le Professeur Sylvie ROGEZ,

Mme. le Professeur Marie-Laure DARDE,

Soyez assurés de ma haute considération.

A M. le Docteur Thierry PISTONE,

Vous avez su me donner de judicieux conseils aux moments opportuns. Veuillez croire en mon profond respect.

A ma directrice de thèse,

Mme. Mahussi D'ALMEIDA-FOURQUET.

Au service de Parasitologie, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour.

Aux techniciens du PTBM, notamment Brigitte, Evelyne, Sylvie, qui m'ont accueillie chaleureusement et m'ont transmis leur savoir-faire en biologie en biologie moléculaire, très utile lorsque l'on débute...

A Evelyne qui, par sa bonne humeur, m'a encouragée tout au long de cette longue période.

## A ma famille et amis

A mes parents,

Je vous remercie chaleureusement de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir inculquer des principes et des valeurs humaines auxquelles je crois encore plus fort aujourd'hui. Je vous témoigne tout mon amour.

A mes frères, Guillaume et Bertrand,

Quelle chance de vous avoir à mes côtés ! Affectueuse et sereine sont pour moi les adjectifs qui définissent notre relation. Il y a toujours de la bonne humeur dans l'air. Que cette situation perdure au fils des années ainsi que vos amours.

A mon mari, Julien,

Avec ces petits tracas, tu m'as encore prouvée combien je peux compter sur toi. Il ne fait aucun doute que ta force m'a permise d'avancer et de ne pas baisser les bras. Une page se tourne enfin et nous permet de nous envoler vers des jours nouveaux aux bords de l'eau pour un nouveau chapitre de notre histoire.

A mon fils, Tom,

Tu es encore petit pour comprendre tous ces tracas de thèse mais tu l'as ressenti à ta manière. Mon Ange, mon cœur est rempli d'amour et de tendresse pour toi. Avec Papa, nous sommes si heureux de partager tous ces moments magiques avec toi.

A mes grands-parents,

Une grande pensée pour ma grand-mère partie récemment.

A mon grand-père que j'admire et que je soutiens dans cette période difficile.

A ma mamie et mon papi, à qui je témoigne toute mon affection et qui m'ont toujours encouragée et aidée.

A mes beaux-parents, Cathy et Alain,

Je profite de cette page pour vous témoigner toute mon affection et vous remercier de votre gentillesse et votre générosité. Je crois que des beaux-parents si « beaux », il n'y en a pas beaucoup.

A toute ma (belle-) famille,

Je vous remercie pour tous ces encouragements et pour l'aide précieuse que vous nous avez apportée tout au long des années.

A mes amies de longue date,

Les années passent et toujours la même amitié, merci beaucoup.

A mes amis internes,

J'ai été heureuse de croiser votre chemin et de partager ces moments de vie avec vous. J'espère garder contact bien entendu !

A mes amis,

Vous n'en revenez pas, moi non plus, mes études touchent à leurs fins !! J'ai de la chance d'être aussi bien entourée. Je vous remercie de votre soutien et suis impatiente de fêter prochainement de grands événements ! ( N'est-ce pas les parisiens et les suisses ?)



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

TABLE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

1. CLASSIFICATION

1.1 Taxonomie

1.2 Terminologie

1.3 Nomenclature

2. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

2.1 Culture *in vitro*

2.2 Morphologie

2.3 Cycle parasitaire hypothétique et mode de reproduction

3. EPIDEMIOLOGIE

3.1 Répartition géographique du parasite

3.2 Répartition géographique des différents sous-types

3.3 Hôte et réservoir du parasite

3.4 Mode de transmission

3.5 Facteurs de risques

4. PATHOGENICITE

4.1 Troubles digestifs

4.2 Manifestations allergiques

4.3 Virulence des sous-types

4.4 *Blastocystis* spp. : pathogène ou pas ?

5. PHYSIOPATHOLOGIE

6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

6.1 Diagnostic direct

6.2 Diagnostic indirect

7. TRAITEMENT

- 7.1 Le métronidazole FLAGYL®
- 7.2 Le cotrimoxazole BACTRIM®
- 7.3 Le nitazoxanide
- 7.4 la paromomycine HUMATIN®
- 7.5 ULTRALEVURE®
- 7.6 Autres molécules

## 8. OBJECTIFS DE L'ETUDE

## DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE

- 1. RECRUTEMENT DES PATIENTS
- 2. LA PREPARATION DES ECHANTILLONS DE SELLES
  - 2.1 Méthode au chlorure de Césium (41, 99)
  - 2.2 Méthode avec tampon PBS sur culot de centrifugation
  - 2.3 Méthode avec tampon PBS sur surnageant
- 3. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE
  - 3.1 Extraction manuelle
  - 3.2 Extraction automatique
- 4. LA PCR
  - 4.1 choix des amorces (17, 76, 103, 104)
  - 4.2 La préparation du mix
- 5. LE SEQUENÇAGE
  - 5.1 Mode opératoire
  - 5.2 Purification des séquences
  - 5.3 Détermination de la séquence d'ADN
  - 5.4 Analyse des séquences et arbre phylogénique

## TROISIEME PARTIE : OPTIMISATION DE LA METHODE EMPLOYEE ET PERSPECTIVES D'EVOLUTION

- 1. OPTIMISATION DE LA PCR
  - 1.1 Première étape: détermination de la concentration optimale en MgCl<sub>2</sub>
  - 1.2 Deuxième étape: temps de dénaturation et d'hybridation
  - 1.3 Deuxième étape : température d'hybridation
  - 1.4 Troisième étape : échantillons à faible signal
  - 1.5 Quatrième étape: diminution des inhibiteurs de PCR
- 2. SENSIBILITE DE NOTRE TECHNIQUE COMPAREE AUX AUTRES METHODES
  - 2.1 Préparation de l'échantillon avant extraction
  - 2.2 Culture avant extraction

2.3 Extraction automatique et extraction manuelle

2.4 PCR conventionnelle et coinfections

3. PERSPECTIVES D'AVENIR

## QUATRIEME PARTIE : ETUDE PROSPECTIVE AU C.H.U DE BORDEAUX ; RESULTATS ET DISCUSSION

1. PREVALENCE DES PARASITES RETROUVES A L'EPS

2. COINFECTIONS DU *BLASTOCYSTIS* SPP. AVEC D'AUTRES PARASITES INTESTINAUX.

3. ANALYSE EPIDEMIOLOGIQUE

3.1 Prévalence du *Blastocystis* spp.

3.2 Répartition en fonction des services hospitaliers

3.3 *Blastocystis* spp. et immunodépression

3.4 Répartition homme / femme

3.5 Répartition en fonction de l'âge

3.6 Habitation rurale / urbaine et contact avec les animaux

3.7 Répartition selon les sous-types

3.8 Voyages récents

4. APPROCHE CLINICO-BIOLOGIQUE

4.1 Aspect des selles

4.2 Syndrome inflammatoire et fièvre

4.3 Signes digestifs

4.4 Densité parasitaire et symptomatologie digestive

4.5 Signes cutanés

4.6 Traitement

5. SYNTHESE DE L'ETUDE

6. CONDUITE A TENIR DEVANT LA PRESENCE DE *BLASTOCYSTIS* SPP.

CONCLUSION

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES



# TABLE DES ABREVIATIONS

|        |  |
|--------|--|
| C.H.U  | centre hospitalier universitaire                               |
| EF-    | Facteur d'élongation   |
| ELISA  | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                              |
| EPS    | examen parasitologique des selles                              |
| FECT   | Formol Ethylacétate  |
| FV     | forme vacuolaire   |
| GM-CSF | Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor               |
| HSP    | Heat shock protein   |
| Ig     | Immunoglobuline  |
| IL     | Interleukine   |
| NaCl   | Chlorure de Sodium   |
| PAR    | Protease-Activated Receptors                                   |
| PCR    | polymerase chain reaction                                      |
| RAPD   | Random Amplified Polymorphic DNA                               |
| RFLP   | Restriction Fragment Length Polymorphism                       |
| TEM    | microscopie électronique à transmission                        |
| v-ATPB | sous-unité B non catalytique de l'ATPase à protons vacuolaires |
| XIVC   | Xenic <i>In Vitro</i> Culture                                  |

# INTRODUCTION

*Blastocystis* spp. a été décrit dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle mais ce n'est que depuis ces vingt dernières années que la biologie de *Blastocystis* spp. est mieux comprise (1). *Blastocystis* spp. est un parasite commun, vivant dans le tube digestif de son hôte et retrouvé dans les selles d'origines humaines et animales (2). Bien qu'il compte parmi les parasites intestinaux les plus fréquemment retrouvés à l'examen parasitologique des selles (EPS), quelques interrogations subsistent à propos de ce mystérieux parasite (1, 3, 4). En effet, son cycle biologique, sa diversité génétique et son rôle pathogène font l'objet de nombreux travaux et de nombreuses controverses ; c'est pourquoi il apparaît intéressant d'étudier, au sein du laboratoire de parasitologie-mycologie du C.H.U. de Bordeaux, sa diversité génétique par la mise au point d'une technique de PCR conventionnelle suivie d'un séquençage permettant d'identifier les différents sous-types de *Blastocystis* spp.. Par une étude prospective se déroulant sur sept mois, nous avons étudié la population porteuse de *Blastocystis* spp. par une approche épidémiologique, clinique et biologique.

# PREMIERE PARTIE : GENERALITES

## 1. CLASSIFICATION

### 1.1 Taxonomie

*Blastocystis* spp., connu depuis **1912** sous le nom de *Blastocystis hominis* chez l'homme, a été décrit pour la première fois par Emile Brumpt (5). Son aspect morphologique (grande variation de taille, absence d'organe locomoteur, absence de division cellulaire) a permis de le classer au sein des levures intestinales non pathogènes saprophytes (5).

Les travaux de Zierdt en **1967** et **1973** ont remis en cause cette classification en se basant sur des caractères physiologiques et morphologiques (4, 6, 7). Ainsi, *Blastocystis hominis* présenterait plutôt les caractères d'un protozoaire et non d'une levure puisque c'est un parasite anaérobie strict, incapable de pousser sur des milieux de culture destinés aux éléments fongiques et bactériens, mais capable de se développer sur des milieux utilisés pour la culture des protozoaires. De plus, il est naturellement résistant à l'amphotéricine B (antifongique) et sensible aux anti-protozoaires (7).

En **1996**, une étape importante est franchie par Silberman qui prouve, par l'analyse de gènes de l'ARN ribosomique 18S, le rattachement du parasite non plus aux protozoaires mais au groupe des **Straménophiles** appelé aussi Hétérokonte ou Chromiste (figure 1) (8) ; ce groupe faisant partie du sous-règne des Eucaryotes, illustré dans la figure 1 (1). En effet, la structure de l'ARN ribosomique 18S, par ses domaines hautement conservés au cours de l'évolution, se prête bien aux études phylogéniques. Les Straménophiles sont des protistes uni- ou multicellulaires comprenant des espèces hétérotrophes et photosynthétiques comme, entre autres, les diatomées et les algues brunes (figure 1). Le parasite s'apparenterait à un flagellé *Proteromonas* bien que ne possédant pas de flagelles (hétérokonta : à flagelles différents). Ainsi, *Blastocystis hominis* ne présente ni les caractéristiques d'un champignon ni celles d'un protozoaire et ne possède pas non plus de cils, c'est pourquoi il a été placé dans

une nouvelle classe **Blastocystea** dans le sous-embranchement des Opalinata, sous-règne des Chromobiota et règne des Chromies (1). Ce rattachement aux Straménophiles a été confirmé par l'analyse moléculaire d'autres gènes comme les protéines de choc thermique ou Heat Shock Protein (HSP) 70C, le facteur d'élongation EF-2, ou bien encore la sous-unité B non catalytique de l'ATPase à protons vacuolaires v-ATPB (1, 4, 9).

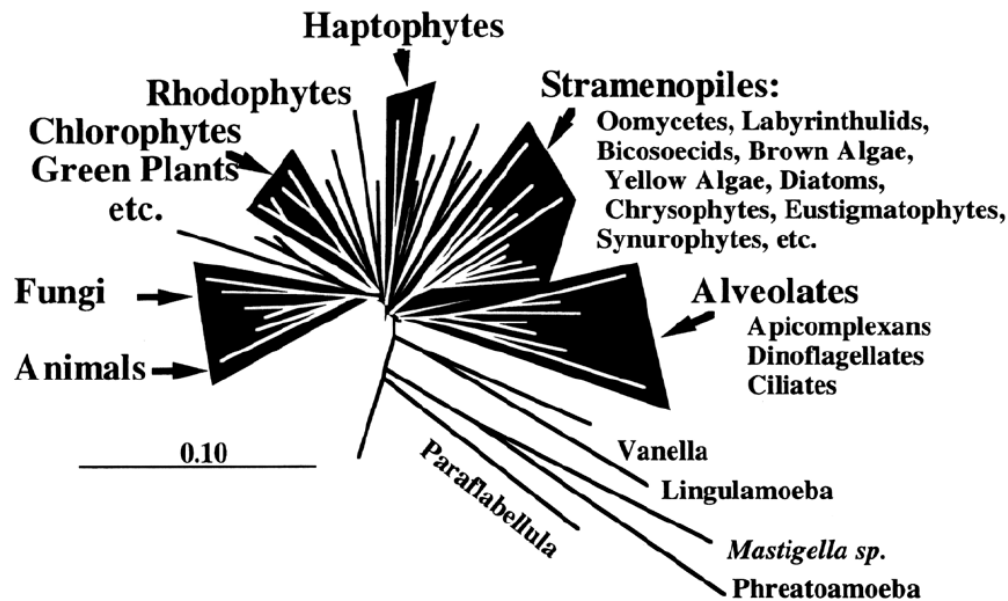


Figure 1 : positionnement des straménophiles au sein des eucaryotes par l'ARN 16S (10)

## 1.2 Terminologie

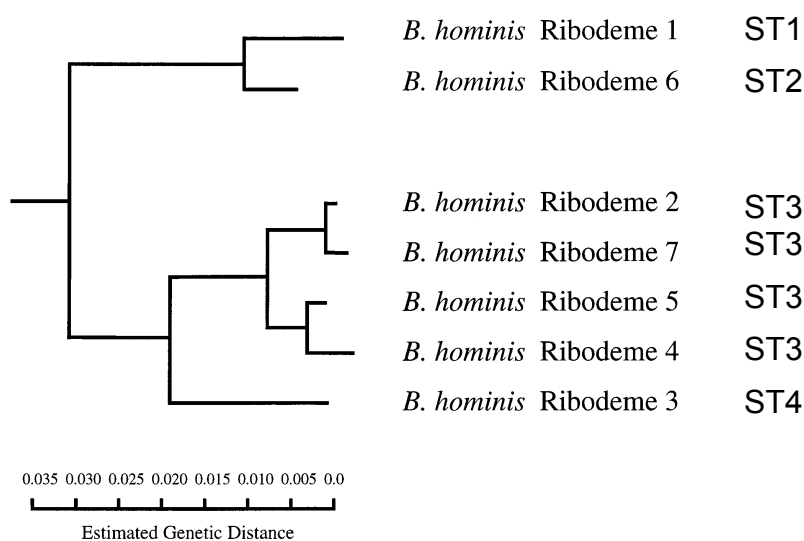
De nos jours, l'analyse relative à la position taxonomique du parasite n'est plus remise en cause, par contre sa désignation au sein de l'espèce oui. Isolé pour la première fois chez l'Homme et nommé par la suite *Blastocystis hominis*, ce parasite a été retrouvé chez de nombreux animaux tels que les porcs, les chats, les oiseaux, pour ne citer que les plus fréquents (2). Les auteurs ont utilisé pour décrire la souche animale le nom du parasite *Blastocystis* suivi du nom de l'animal, comme par exemple *Blastocystis rattii* chez le rat (9). Cependant, d'un point de vue morphologique, il est établi qu'il n'existe aucune différence notable entre les souches humaines et animales ; c'est pourquoi désormais la dénomination la plus juste est d'utiliser le terme *Blastocystis* spp. pour toutes les souches isolées.

## 1.3 Nomenclature

Une grande diversité génétique a été démontrée parmi les souches humaines et animales. Grâce à des techniques de biologie moléculaire, de nombreux auteurs ont étudié les variations génétiques de l'ARN ribosomique 18S (2, 4).

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe plus connue sous le terme de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou encore l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de produits de PCR de l'ARN ribosomique 18S ont permis de confirmer cette diversité génétique. Ainsi, Clark (11), Yoshikawa *et al.* (12 ; 13), et Arisue *et al.* (4) ont prouvé l'existence d'au moins neuf sous-espèces ou ribotypes.

En 2007, Stensvold *et al.* publient un consensus sur la dénomination des différents sous-types de *Blastocystis* spp. (9) dans lequel il met en corrélation les résultats phylogéniques observés par différents auteurs, dont ceux de Clark détaillés dans la figure 2 (11) et propose une classification universelle exposée par la figure 3. Il suggère que le terme *Blastocystis* spp. soit employé, associé à un sous-type (ST) allant de 1 à 9.



*ribodème = ribotype*                      *ST : sous-type*

Figure 2 : comparaison de la nomenclature en ribotype établie par Clark (11) et celle établie par Stensvold et al. (9)

| Clade <sup>a</sup> | Subtype <sup>b</sup> | Group and subtype <sup>c</sup> | Subtype <sup>d</sup> | Ribodeme <sup>e,f</sup>   | Subgroup <sup>g</sup> | Cluster <sup>h</sup> | Subtype <sup>i</sup> | Consensus                         |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|
| I                  | I                    | I/1                            | 1                    | <b>1</b> , 8 <sup>j</sup> | III                   | E                    | 1, 1 variant         | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 1 |
| II                 | II                   | II/5                           | 5                    | <b>6</b>                  | V                     | C, D                 | – <sup>k</sup>       | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 2 |
| –                  | X                    | I+II/1+5 outlier               | –                    | –                         | –                     | –                    | –                    | Chimaeric sequence                |
| III                | III                  | III/3                          | 3                    | <b>2, 7, 4?</b> , 5?      | I, II                 | A                    | 3                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 3 |
| IV                 | IV                   | IV/7                           | 7                    | <b>3</b>                  | IV                    | B                    | –                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 4 |
| –                  | IVa                  | IV/7 outliers                  | –                    | –                         | –                     | –                    | –                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 8 |
| V                  | V                    | V/6                            | 6                    | –                         | –                     | –                    | –                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 5 |
| VI                 | VI                   | VI/4                           | 4                    | 9 <sup>j</sup>            | –                     | –                    | 4                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 6 |
| –                  | VIa                  | VI/4 outliers                  | –                    | –                         | –                     | –                    | –                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 9 |
| VII                | VII                  | VII/2                          | 2                    | 10                        | VI <sup>m</sup>       | –                    | 2                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 7 |
| –                  | VII                  | VII/2 outliers                 | –                    | –                         | –                     | –                    | –                    | <i>Blastocystis</i> sp. subtype 7 |

<sup>a</sup>Clades described by Arisue et al. [20] and Yoshikawa et al. [26].

<sup>b</sup>Subtypes described by Scicluna et al. [24].

<sup>c</sup>Groups and subtypes described by Noël et al. [7].

<sup>d</sup>Subtypes described by Yoshikawa et al. [12,30].

<sup>e</sup>Ribodemes are groups that share the same SSU-rDNA PCR-RFLP patterns and are described by Clark [4] and Yoshikawa et al. [12].

<sup>f</sup>Ribodemes in bold are those originally described by Clark [26].

<sup>g</sup>Subgroups described by Böhm-Glönig et al. [10] on the basis of PCR-RFLP analysis and partial SSU-rDNA sequences.

<sup>h</sup>Clusters described by Stensvold et al. [25] on the basis of PCR and sequencing analysis of partial SSU-rDNA sequences.

<sup>i</sup>Subtypes described by Yoshikawa et al. [12] using PCR-STs.

<sup>j</sup>Ribodemes 8 and 9 described by Yoshikawa et al. [12] differ from those described by Kaneda et al. [14].

<sup>k</sup>– symbols indicate no equivalent described.

<sup>l</sup>Question mark indicates that the subtype equivalence is probable but not proven.

<sup>m</sup>Subgroup VI described by Thathaisong et al. [18] equals ribodeme 10 described by Yoshikawa et al. [12] (K.S.W. Tan, unpublished).

Figure 3 : comparaison des différentes terminologies employées et proposition d'une nouvelle classification en sous-types (9)

Depuis, la classification s'est étoffée avec douze sous-types identifiés dont neuf isolés chez l'homme (3).

## 2. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

### 2.1 Culture *in vitro*

La culture du *Blastocystis* spp., qui peut s'avérer utile pour le diagnostic, a permis une étude approfondie de sa description morphologique, l'étude du cycle parasitaire ou encore l'analyse des modes de reproduction. Cette culture présente l'avantage d'amplifier un plus grand nombre de parasites, rendant sa recherche plus aisée par rapport à la microscopie optique mais aussi de maintenir les souches en culture pour des études ultérieures (14). En routine, elle joue un rôle mineur, la microscopie optique étant la méthode de choix pour l'identification des parasites dans les selles (15).

Classiquement, Il existe trois types de milieu de culture : le milieu **xénique** ou *Xenic In Vitro* Culture (XIVC) sur lequel pousse le parasite en présence d'une flore saprophyte indéterminée, **monoxénique** où la flore est constituée d'une seule espèce et le milieu **axénique** sur lequel pousse le parasite en l'absence d'autre organisme.

*Blastocystis* spp. est capable de pousser sur tous les milieux xéniques utilisés pour les amibes, ce qui peut poser problème en cas de coinfection (15).

Les premiers essais de culture ont été réalisés par Barret *et al.* en 1921. Ils ont mis au point la première culture xénique dans un milieu liquide salin contenant du sérum. Ces milieux ont été améliorés et les plus fréquemment utilisés sont les milieux Locke-Egg (LE) et les milieux de Jones (14-17). Le milieu LE appelé aussi «milieu de Boeck et Drbohlav's modifié» est un milieu diphasique décrit en 1924 et composé de deux phases, l'une solide en pente contenant de l'œuf (réservoir solide de nutriments où pousse le parasite) et l'autre liquide à base de solution de Locke plus ou moins enrichie en sérum de cheval dans lequel le parasite est inoculé. Tous ces milieux sont réduits par incubation sous atmosphère anaérobie (7, 15). Cette culture est rapide car *Blastocystis* spp. pousse en vingt-quatre heures et peut donc être employée à des fins expérimentales mais aussi diagnostiques. Par contre, elle présente comme inconvénient le repiquage de la souche isolée en culture tous les trois à quatre jours pour conserver les souches (7).

Un autre milieu expérimenté, est le milieu liquide RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté en sérum. Facile à préparer, il permet la croissance et la multiplication rapide des parasites (18).

Pour maintenir les souches déjà isolées sur d'autres milieux, Tan *et al.* ont testé un milieu solide, le milieu agar, qui permet de repiquer les cultures seulement toutes les deux semaines (1, 19). Il existe une particularité concernant ST7 qui pousse en culture *in vitro* deux fois plus lentement que les autres sous-types : 50 à 80 heures au lieu de 20 à 30 heures pour ST4 (20). Cela peut s'expliquer par une température d'incubation plus élevée en raison du réservoir aviaire fréquemment retrouvé pour ce sous-type qui possède une température corporelle, en particulier le poulet, supérieure à celle des mammifères (1).

L'axénisation, qui consiste à rendre une culture dépourvue de germes, est importante dans le cas d'études moléculaires et biochimiques. Elle tend à éliminer toutes les bactéries présentes dans le milieu par addition d'antibiotiques tels que ampicilline, streptomycine, amphotéricine B (21). Ce processus est relativement laborieux puisqu'il peut prendre des semaines voire des mois (1). Comme d'autres auteurs, Zierdt et Williams en 1974 (22), et Lanuza *et al.* en 1997 (21), se sont servis de milieux xéniques pour débiter l'axénisation (15). Ils utilisent le milieu LE, tandis que d'autres utilisent un autre milieu, celui d'Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplémenté en sérum de cheval (15, 19).

## 2.2 Morphologie

Ce parasite est un organisme polymorphe. En effet, quatre formes sont fréquemment décrites dans la littérature : vacuolaire, granulaire, amiboïde et kystique. Son ultrastructure a été étudiée en microscopie électronique à transmission (TEM) et microscopie électronique à balayage, directement sur les échantillons de selles infectées et après culture *in vitro*.

### 2.2.1 La forme vacuolaire (FV) ou forme à vacuole centrale (6)

Comme son nom l'indique, elle est nommée ainsi du fait de sa vacuole centrale. C'est la forme la plus fréquemment rencontrée dans les échantillons de selles fraîches et après cultures *in vitro*.

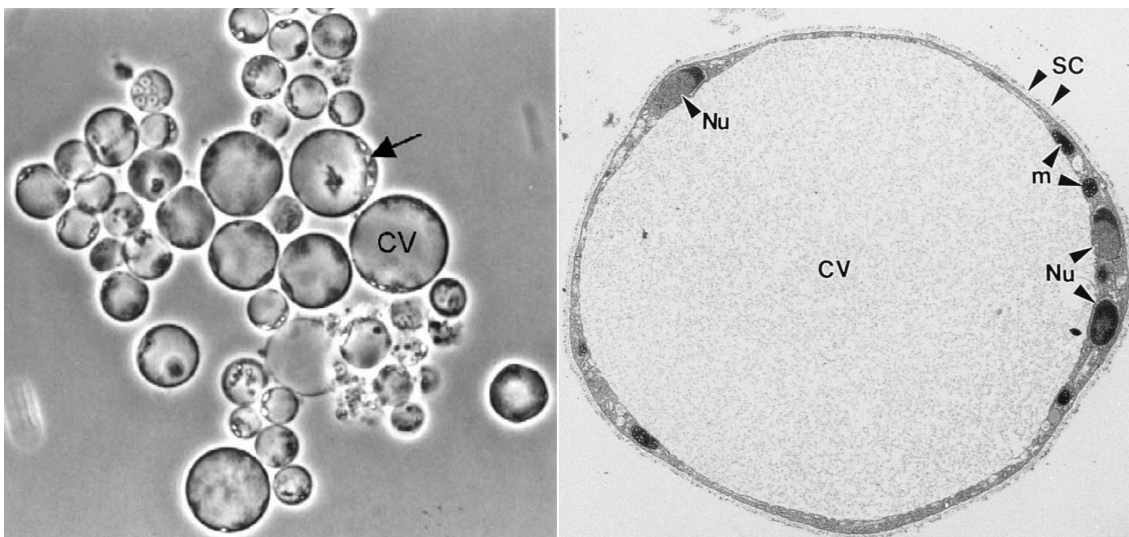
De forme sphérique et hétérogène en taille, elle mesure de 4 à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne avec des tailles allant de 2 à 200  $\mu\text{m}$ .



### 2.2.1.1 La vacuole

La forme vacuolaire présente une large et caractéristique vacuole occupant en moyenne 90% du volume de la cellule, bordée par une fine membrane cytoplasmique en périphérie (figure 4) (1, 7). Cette vacuole apparaît optiquement vide mais est composée de très fines granulations visibles en TEM (23). Son rôle n'est pas encore élucidé, néanmoins plusieurs hypothèses ont été avancées :

- elle jouerait un rôle dans la reproduction asexuée par schizogonie (7)
- elle pourrait aussi servir de lieu de stockage des organites ou bien de lieu de dépôts des corps apoptotiques pendant la mort cellulaire programmée (1)
- elle serait un réservoir de cystéine protéases impliquées dans le développement, la différenciation et la pathogénicité du *Blastocystis* spp. (24).



CV : vacuole centrale  
Nu : noyau

Flèche : organites  
m : mitochondrie

SC : manteau de surface

Figure 4 : forme vacuolaire en microscopie optique et TEM (6, 23)

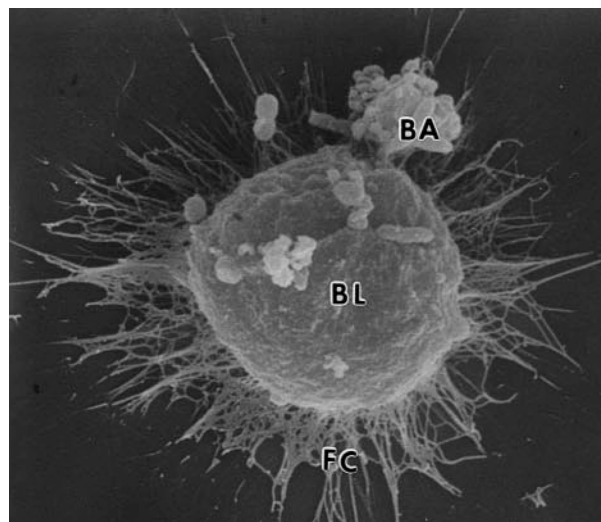
### 2.2.1.2 Le cytoplasme

Le cytoplasme est réduit à une mince bordure délimitant la vacuole, difficilement visible en microscopie optique. Au microscope électronique à transmission (TEM), il est observé que ce cytoplasme contient les organites des eucaryotes tels que les noyaux, l'appareil de Golgi, les mitochondries, le réticulum endoplasmique lisse et granuleux, ainsi que des microtubules tels que l'illustre la flèche de la figure 4 ci-avant.

### 2.2.1.3 Le manteau de surface

La membrane cytoplasmique de la cellule est entourée d'une couche externe désignée sous le nom de « surface coat » que nous traduirons par manteau de surface (figure 4). Ce manteau de surface est aussi appelé « slime layer » ou capsule car il rappelle vaguement la capsule bactérienne.

D'épaisseur variable, il est plus épais dans les selles fraîchement émises qu'après une culture prolongée. Il aurait un rôle d'adhérence des bactéries à des fins nutritionnelles, serait inutile dans les cultures axéniques et riche en nutriments, d'où son épaisseur réduite voire inexistante. Le manteau de surface est composé d'un réseau fibrillaire et de quelques extensions plus longues, individualisées, de 5 à 10  $\mu\text{m}$  à la périphérie. Grâce à la microscopie électronique à balayage, Zaman *et al.* ont pu illustrer cette structure comme le montre la figure 5 ci-dessous (25).



BL : *Blastocystis* spp.

FC : manteau de surface

BA : bactérie

Figure 5: manteau de surface de *Blastocystis* spp. (25)

Le manteau de surface serait impliqué dans plusieurs étapes :

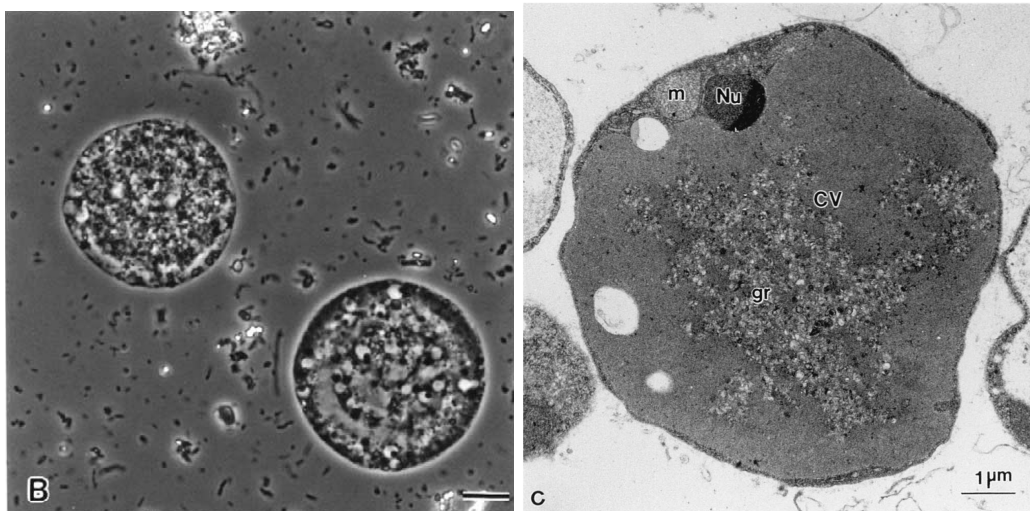
- Il jouerait un rôle nutritif en piégeant puis digérant les bactéries
- Il jouerait un rôle de protection contre le choc osmotique
- Il servirait de barrière mécanique pour les protéines plasmatiques impliquées dans la réponse immune (1).

## 2.2.2 La forme granulaire

Cette forme est rarement présente dans les échantillons de selles fraîches mais retrouvée dans les cultures *in vitro* xéniques et âgées (26). Elle a longtemps été décrite comme un schizonte (23).

A l'exception de ses nombreuses granulations visibles en microscopie optique et présentes en majorité dans la vacuole centrale, elle est morphologiquement identique à la forme vacuolaire (figure 6). Sa taille est légèrement supérieure à la forme précédente, variant en moyenne de 10 à 80  $\mu\text{m}$ . Il existe une grande variation de l'apparence des granulations selon leurs localisations, cytoplasmique ou vacuolaire. Elles sont décrites comme de petites vésicules, ou bien des granules cristallins voire des gouttelettes lipidiques (6). Grâce à la TEM, trois types de granulations sont observées : métaboliques (dans le cytoplasme), lipidiques (dans le cytoplasme et dans la vacuole centrale) et reproductrices (dans la vacuole centrale). Il semblerait que certains de ces granules soient des mitochondries (7).

En réalité, la forme granulaire serait une forme vacuolaire contenant des granulations plutôt qu'un réel stade de développement du parasite (1).



CV : vacuole centrale  
m : mitochondrie

gr : granulations

Nu : noyau

Figure 6 : forme granulaire en microscopie optique et TEM (6, 23)

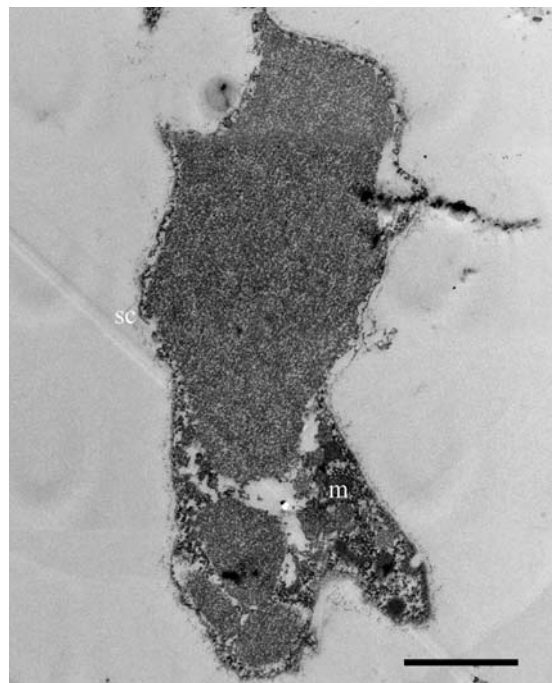
### 2.2.3 La forme amiboïde

Elle a été retrouvée chez un patient présentant des selles diarrhéiques (1). Rarement rapportée, diverses descriptions morphologiques contradictoires ont été notées.

*In vivo*, *Blastocystis* spp. prendrait une forme ovalaire avec un pseudopode distinct. La large vacuole est absente. On observe des inclusions triangulaires dans le cytoplasme qui remplissent la cellule (18).

Tan et Suresh ont étudié cette forme particulière et décrivent *in vitro* une forme irrégulière de taille variant de 10 à 15 µm avec un ou plusieurs noyaux assez volumineux, une vacuole centrale, un manteau de surface, de nombreux appareils de Golgi, des mitochondries dans le cytoplasme et une ou deux longues extensions appelées pseudopodes partiellement distribuées sur le manteau de surface périphérique (figure 7) (26). Considérant la diversité génétique du parasite, il est plausible que ces différences soient dues à des variations génétiques (1).

La présence de bactéries à l'intérieur de cette forme permet d'évoquer un rôle nutritionnel par phagocytose des bactéries, qui favoriserait l'enkystement (27).



sc : manteau de surface      m : mitochondrie

Figure 7 : forme amiboïde en microscopie à contraste de phase (26)

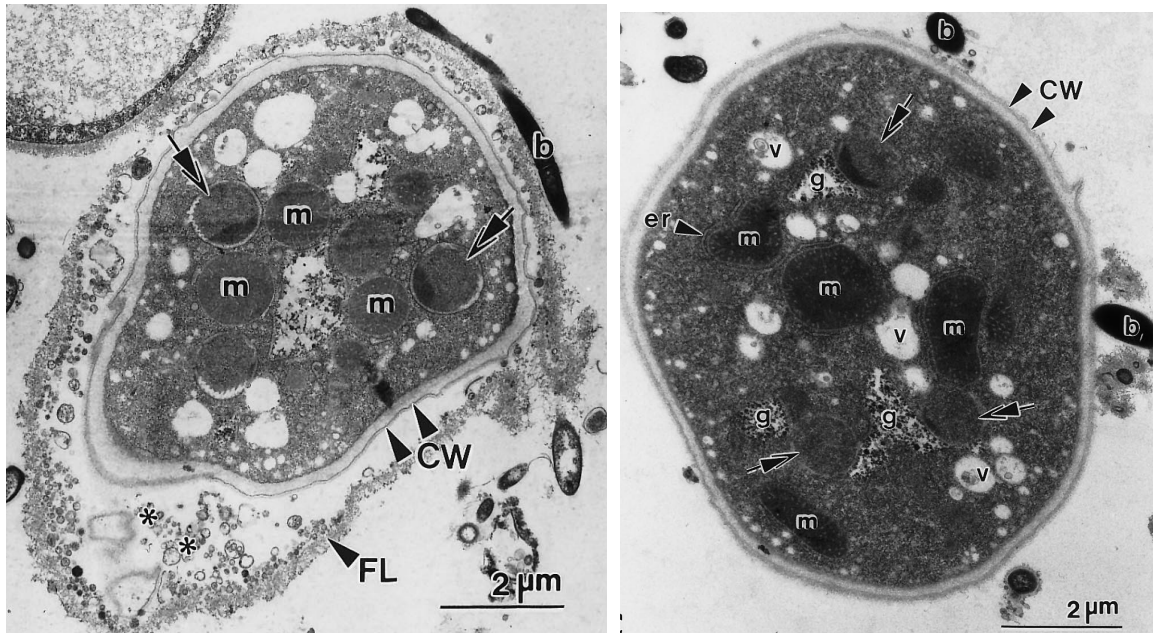
#### 2.2.4 la forme kystique

De petite taille (2 à 5  $\mu\text{m}$ ) par rapport aux autres, la forme kystique a été découverte tardivement car souvent confondue avec des débris et pas toujours observée en culture. De forme sphérique ou ovoïde, elle est entourée d'une épaisse paroi composée de plusieurs couches recouvertes ou non par une structure fibrillaire correspondant au manteau de surface (1). La présence de cette structure fibrillaire correspondrait au stade **prékystique** puis elle disparaîtrait dans les formes kystiques matures (figure 8).

La vacuole centrale est absente mais les organites sont présents. Le cytoplasme du kyste comprend un à quatre noyaux selon le stade de maturation, des granulations, des petites vacuoles, des inclusions lipidiques, des mitochondries et des dépôts de glycogène.

D'après les résultats d'études de viabilité, ces kystes pourraient survivre dans l'eau plus de 19 jours à température ambiante et deux mois à 4°C, mais seraient sensibles aux températures extrêmes et aux désinfectants usuels. Tandis que les formes vacuolaires et granulaires sont sensibles aux changements de température, aux chocs osmotiques et à l'exposition à l'air (1, 28).

La forme kystique confère donc une résistance dans le milieu extérieur et serait la forme de résistance du parasite et donc le moyen de contamination et de dissémination le plus probable (6).



FL : structure fibrillaire

V : petite vacuole

er : réticulum endoplasmique

CW : paroi du kyste

g : glycogène

\* : autres matériels

m : mitochondrie

b : bactérie

→ noyau

Figure 8 : forme prékystique et kystique (avec et sans structure fibrillaire) (29)

### 2.2.5 Autres formes

Il a été rapporté des formes sans vacuoles nommées avacuolaires ou au contraire multivacuolaires. Ces formes sont relativement peu décrites et ont été retrouvées dans les selles fraîches après culture (30).

## 2.3 Cycle parasitaire hypothétique et mode de reproduction

Du fait d'un manque de modèle animal approprié, le cycle ainsi que le mode de division de *Blastocystis* spp. n'est à ce jour pas encore bien défini (31). Sauf les observations de Stenzel et al., il est clairement établi que la forme vacuolaire joue un rôle prédominant dans le cycle (1, 7, 32).

Toutes les hypothèses s'accordent à dire que la **forme infectante** serait la **forme kystique** (1, 23, 32). Le parasite se reproduit uniquement de façon asexuée avec pour principal mode de reproduction, la **division binaire** c'est-à-dire qu'une cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques par division cytoplasmique et nucléaire.

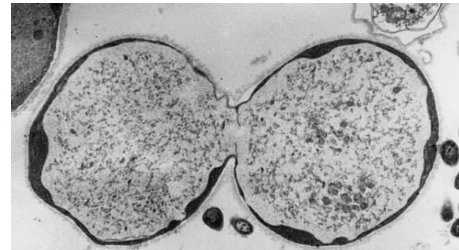
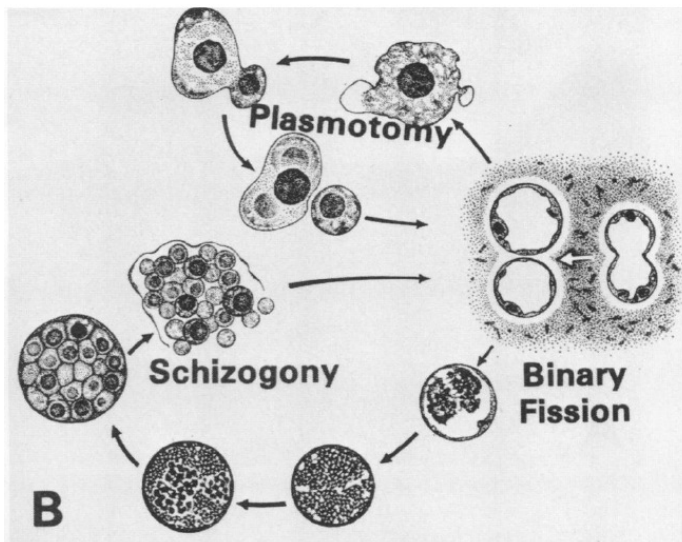
### 2.3.1 Cycle hypothétique faisant intervenir quatre modes de reproduction asexuée (1973)

Dès 1973, Zierdt *et al.* proposent une ébauche de cycle basée sur des observations faites en microscopie optique qu'ils complètent par une autre étude en 1991 (7). Il n'y aurait pas un, mais quatre modes de reproduction représentés dans la figure 9 avec la division binaire comme principal mode. A chaque forme différente de *Blastocystis* spp. correspondrait un mode de division :

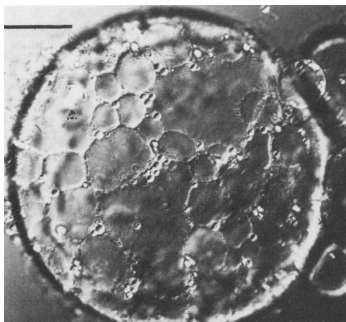
- La forme vacuolaire se diviserait par **schizogonie**, c'est à dire qu'il y aurait multiplication des cellules filles à l'intérieur de la cellule dont le nombre varie de un à cent au sein de la cellule mère, puis rupture de celle-ci et libération des cellules filles dans le milieu. De plus, elle se diviserait aussi par **endodyogénie** qui entraîne la division de la vacuole centrale en deux petites vacuoles avec formation d'une nouvelle membrane entre ces deux vacuoles filles (18).

- La forme granulaire aurait un mode de reproduction par **division binaire**.

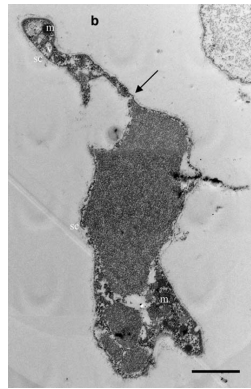
- La forme amiboïde, elle, se reproduirait par **plasmotomie** c'est à dire qu'il y aurait formation d'une cellule fille à partir d'une fine extension cytoplasmique de la surface cellulaire de la cellule mère. La membrane cytoplasmique et le cytoplasme sont intacts et le matériel nucléaire retrouvé dans chacune des cellules (7).



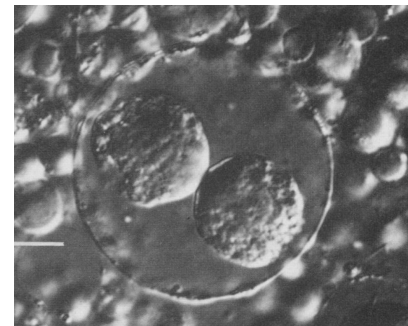
*Division binaire (28)*



*Schizogonie (7)*



*Plasmotomie (33)*



*Endodyogénie (7)*

*Figure 9 : schéma proposés par Zierdt (7) et illustrations en microscopie des différents modes de reproduction de Blastocystis spp.*

### 2.3.2 Cycle hypothétique basé sur un cycle externe et un cycle d'auto-infection (32)

En 1995, Singh *et al.* (32) proposent un cycle composé d'une « transmission externe » par un kyste à paroi épaisse et d'un cycle d' « auto-infection » caractérisé par la présence d'un kyste à paroi mince. Dans le cycle à « **transmission externe** », la **forme vacuolaire** se différencierait en **forme amiboïde** puis en **prékyste**. Il se produirait ensuite une schizogonie à l'intérieur de la forme prékyستique dans le tractus gastro-intestinal entraînant la formation du **kyste à paroi épaisse**, qui une fois rompu libérerait des formes vacuolaires filles. Il propose aussi un cycle d' « **auto-infection** » où la **forme vacuolaire** se



différencierait en forme **multivacuolaire** puis **prékystique** dans laquelle la schizogonie a lieu pour aboutir à la formation d'un **kyste à paroi mince** au niveau du tractus gastro-intestinal. La rupture de ce kyste entraîne la libération des formes vacuolaires filles. La division binaire est, elle aussi, présente dans les deux cycles et permettrait la multiplication des formes amiboïdes et vacuolaires.

### 2.3.3 Cycle hypothétique de Stenzel et Boreham basé sur les formes avacuolaires et multivacuolaires (23)

Stenzel et Boreham remettent en question les cycles précédemment cités (cycle d'auto-infection et de transmission externe) en raison des discordances morphologiques rencontrées par rapport à de nombreuses études notamment sur la forme kystique. Selon eux, les deux formes kystiques différentes (à paroi mince et à paroi épaisse) n'existent pas ; de plus, le parasite aurait, un **mode de reproduction unique** par **division binaire**. Ils établissent donc, un autre cycle parasitaire avec comme forme intestinale, la forme dépourvue de vacuole dénommée la forme avacuolaire. Cette dernière se transformerait en forme multivacuolaire par coalescence de petites vacuoles apparaissant dans le cytoplasme. La **contamination** se fait toujours par **ingestion de kystes** qui, par l'action des sucs gastriques, libèrent des **formes avacuolaires**. Celles-ci se transformeraient peut-être en **formes amiboïdes** et surtout en **formes multivacuolaires** donnant naissance à des **kystes intermédiaires** (par extrapolation le prékyste) puis des **kystes matures**.

Ils décrivent la présence des formes vacuolaires et granulaires uniquement en culture *in vitro* et non à l'examen direct dans les selles fraîches. Ces données sont en contradiction avec la méthode diagnostique utilisée basée sur l'identification de ces formes à l'examen direct en microscopie optique (1).

### 2.3.4 Cycle hypothétique reprenant des études récentes : proposition d'un nouveau cycle

Ces dix dernières années, de nombreux auteurs tels que, T.C. Tan et Suresh (26), Suresh *et al.* (27), Moe *et al.* (28) ont étudié plus précisément la forme amiboïde, la forme kystique ainsi que les transitions entre les différentes formes du parasite dans le cycle.

T.C. Tan et Suresh ont étudié la présence de la **forme amiboïde**, après culture *in vitro*, chez des patients symptomatiques ou non. Toutes les cultures de selles issues de patients symptomatiques présentaient cette forme amiboïde alors qu'elle était absente dans les selles de patients asymptomatiques. Ces observations permettraient d'établir un lien entre cette forme et la pathogénicité du parasite et devrait donc être un stade dans le cycle parasitaire. Cependant, la plupart du temps, cette forme est décrite après culture *in vitro*, ce qui rend son implication *in vivo* difficile à affirmer. Ce même auteur a observé, comme Zierdt en 1991, que la forme amiboïde pouvait se reproduire *in vitro* par **plasmotomie** (7).

La **forme kystique** a été étudiée par deux auteurs, Moe *et al.* et Suresh *et al.* (27, 28). Moe *et al.* ont mis en évidence, *in vitro*, la transformation du kyste en forme vacuolaire en moins de 24 heures. Suresh *et al.*, quant à eux, ont étudié l'enkystement du *Blastocystis* spp. *in vivo*, dans les selles d'un patient diarrhéique présentant des douleurs abdominales. Ses selles ont été examinées sur une période de six mois par microscopie optique puis après culture et TEM. Il constate une excrétion fluctuante du parasite avec alternance des formes vacuolaires et kystiques : l'une étant présente en grande quantité quand l'autre ne l'est pas. Il observe aussi après culture, la transformation, étape par étape, de la forme vacuolaire en kyste. La forme vacuolaire donnerait naissance à la forme granulaire puis à une forme irrégulière probablement amiboïde et enfin à la forme prékystique recouverte du manteau de surface qui disparaît chez le kyste mature.

En 2008, Kevin S.W. Tan élabore un cycle comprenant les principales formes citées précédemment mais ne tient pas compte des dernières études citées précédemment, c'est pourquoi d'après ses observations et celles de T.C. Tan et Suresh, Suresh *et al.* et Moe *et al.*, il est possible de proposer un nouveau cycle parasitaire illustré par la figure 10 mais avec toujours quelques zones d'ombre (1, 26-28).

La **contamination** se fait par l'ingestion de **kystes** qui se transforment en **forme vacuolaire** au niveau intestinal. Cette forme se divise par **division binaire *in vivo*** et peut se diviser par **plasmotomie *in vitro*** comme la forme amiboïde, présente chez les patients ayant une symptomatologie digestive.

La forme vacuolaire peut devenir **granulaire** puis être éliminée dans les selles ou bien directement excrétée. La formation du **prékyste** peut se faire à

partir de ces deux formes et entrainer la libération de la **forme kystique infectante** dans les selles.

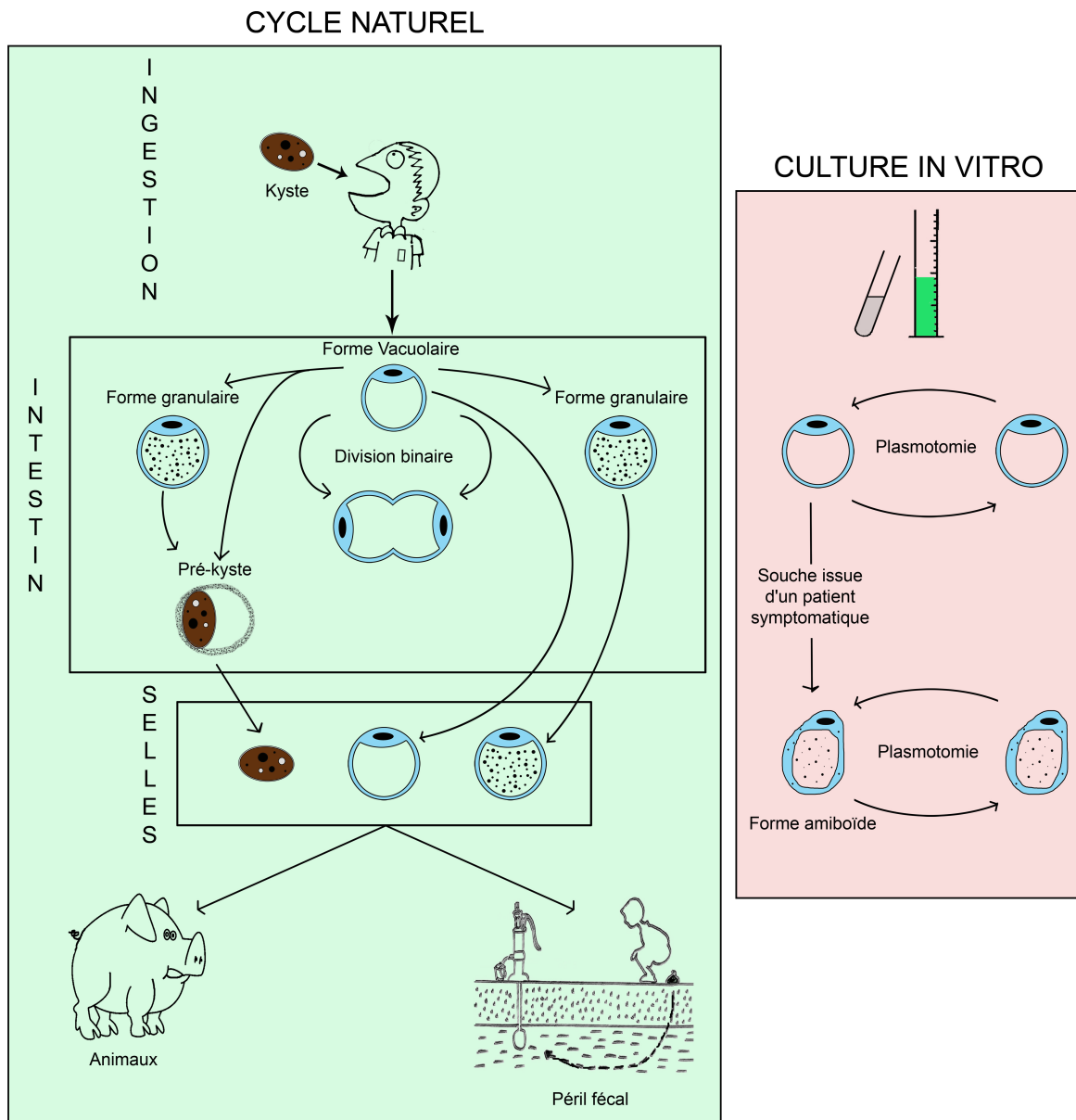


Figure 10 : proposition d'un nouveau cycle parasite in vivo et in vitro

## 3. EPIDEMIOLOGIE

### 3.1 Répartition géographique du parasite

*Blastocystis* spp. est un parasite ubiquitaire présent sur tous les continents (1). De nombreuses études le placent comme étant le parasite le plus fréquemment retrouvé dans les selles de patients symptomatiques ou non (1, 23, 34).

Les pays les plus touchés sont les Pays En Développement (PED) avec une prévalence d'environ 50% contre 10% dans les pays développés (35). Au Japon, la prévalence est particulièrement faible (de 0,5% à 1%) (1). En Europe, la prévalence est de 13,6% en Italie (34) et de 6,1% en France (5, 34).

Il existe une grande disparité de prévalence en fonction des pays y compris au sein même d'un pays. Cette variation a été mise en évidence par Li *et al.* en Chine (36) où la prévalence dans les régions rurales s'élève à 20%. Elle est nettement supérieure à celle observée dans les régions urbaines, évaluée à 3%.

Comparer les prévalences avec une même méthode diagnostique, comme dans l'étude précédente a une réelle valeur épidémiologique. Cependant, la plupart des études utilisent des moyens de dépistage de sensibilités différentes (examen direct, culture, PCR) rendant les résultats difficiles à comparer.

### 3.2 Répartition géographique des différents sous-types

Le parasite revêt une grande diversité génétique. Ainsi, grâce aux analyses moléculaires, 12 sous-types ont été identifiés dont 9 retrouvés chez l'homme (3). Selon une étude de Souppart *et al.* à Lille (37), au sein de la population française, ST3 est le plus fréquemment retrouvé avec une prévalence de 53,5% suivi de ST1 (25,6%), puis ST2 et ST4 (9,3% chacun) et enfin ST7 (2,3%) (37). Dans la plupart des études, cette distribution est respectée avec ST3 en majorité suivi d'une prévalence élevée pour ST1 ou ST2 en fonction du pays puis ST4 et des autres sous-types.

Une autre étude française dirigée par Poirier *et al.* à Clermont-Ferrand (38) remet en cause cette distribution : il semblerait que ST4 soit prédominant dans son étude et il observe que la distribution des sous-types varie non seulement en

fonction de la localisation géographique mais également en fonction de la technique diagnostique employée ; en effet, la prévalence de ST4 varie de 38% à 63% en fonction de la méthode de diagnostic utilisée (38).

A ce jour, il n'existe pas de réelle corrélation entre l'origine géographique et le génotype. Cependant, ST4 est plus fréquemment rencontré en Europe (figure 11) ; ST5 à ST9 sont rarement retrouvés (39) mais ST6 et ST7 sont décrits plus fréquemment en Egypte et au Japon, ST8 en Angleterre, et ST9 au Japon (figure 11).

Des coinfections par l'association de deux sous-types différents de *Blastocystis* spp. ont été rapportés dans environ 5% des cas, la plus fréquente étant l'association du ST1 avec le ST3, les autres étant assez rares (associations citées : ST1/ST2, ST2/ST3) (36). Cependant, il est difficile d'affirmer la réelle proportion des coinfections car certaines méthodes diagnostiques ne permettent pas de les identifier ou bien rendent les résultats ininterprétables.

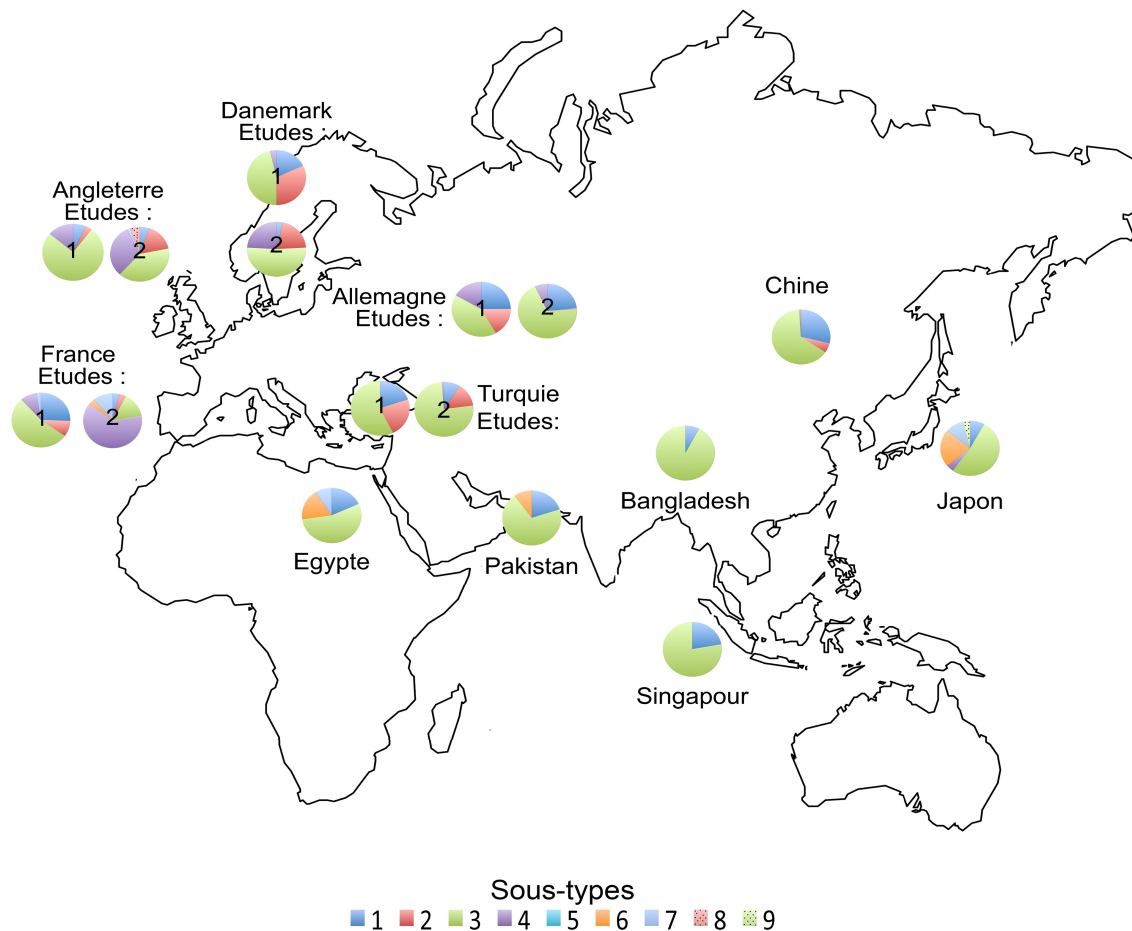


Figure 11: carte sur la répartition des différents sous-types en fonction des pays d'après les données de Souppart et al. (37)

### 3.3 Hôte et réservoir du parasite

*Blastocystis* spp. est un parasite retrouvé aussi bien chez l'homme que dans le règne animal avec une variété d'espèces conséquentes : oiseaux, porcs, reptiles, singes.... Il est donc anthrozoophile (2, 16, 40, 41). De ST1 à ST3, le réservoir du parasite est varié (singes, cochons, chats, oiseaux), sachant que ST3 est le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme (1). Certains sous-types proviennent d'un réservoir particulier répertorié dans le tableau 1, notamment ST6 et ST7 d'origine aviaire. Quant à ST5 et ST9, ils ont été très peu isolés chez l'homme et l'animal (42, 43).

| ST | Réservoir animal  |
|----|---|
| 1  | Primates, porcs, bétail, oiseaux                            |
| 2  | Principalement primates, occasionnellement oiseaux et porcs |
| 3  | Primates, porcs, bétail                                     |
| 4  | Rongeurs  |
| 5  | Porcs, bétail   |
| 6  | Oiseaux   |
| 7  | Oiseaux   |
| 8  | Primates  |
| 9  | aucun   |

Tableau 1: Réservoir animal en fonction des sous-types (20)

La plupart des études s'accordent à dire que *Blastocystis* spp. touche aussi bien les hommes que les femmes avec un sexe ratio proche de 1 (34, 36, 44).

### 3.4 Mode de transmission

Le mode de transmission se ferait par voie oro-fécale, comme de nombreux parasites intestinaux (20). Bien que rarement observée au laboratoire, la forme kystique du parasite serait la forme infectante la plus probable car résistante à l'eau (45, 46). L'ingestion de kystes peut se faire selon quatre modes de transmission : interhumaine, animale-humaine, humaine-animale et animale-animale (47).

## 3.5 Facteurs de risques

### 3.5.1 Les migrants et voyageurs

Le mode de transmission par le péril fécal explique la forte prévalence dans les PED. En effet, les conditions d'hygiène précaires ainsi que la consommation d'eau et d'aliments souillés sont des facteurs de risque d'infection par *Blastocystis* spp. (1). D'autres auteurs confirment l'implication de l'eau comme source d'infection (45, 46). Ainsi, les migrants et voyageurs venant de pays chaud sont des populations à risque (48).

### 3.5.2 Variation saisonnière (14)

Suresh et Smith en 2004, ont mis en évidence l'influence de la saison sur l'excrétion de kystes dont la concentration double pendant la saison chaude d'été jusqu'au début de l'automne ; ces résultats étant en adéquation avec la forte prévalence dans les pays tropicaux.

### 3.5.3 Contacts avec les animaux

En raison du réservoir zoonotique, les personnes travaillant (éleveurs, vétérinaires) ou vivant au contact d'animaux ont un plus grand risque d'être porteurs de *Blastocystis* spp. (23, 31, 48).

### 3.5.4 Cancer et immunodépression

Diverses études mettent en évidence l'immunodépression comme facteur de risque notamment chez les patients atteints du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ayant des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> < 200/mL (34). Ceci étant, il existe un conflit concernant la corrélation entre les symptômes digestifs (diarrhées) et cette pathologie virale car les traitements antirétroviraux entraînent eux-mêmes ces symptômes ainsi qu'une prédisposition aux agents opportunistes (34, 44, 49, 50). De plus, *Blastocystis* spp. ne fait pas parti des agents opportunistes. Il apparait également que les patients d'onco-hématologie, les transplantés cardiaques et rénaux sont aussi des populations à risque (20, 48).

### 3.5.5 L'âge

Les enfants seraient une population à risque notamment chez l'immunodéprimé (51). Ainsi, les enfants traités par corticothérapie pour un

syndrome néphrotique auraient une susceptibilité augmentée au *Blastocystis* spp. (20).

### 3.5.6 Pathologie psychiatrique

Une étude a prouvé l'incidence élevée de *Blastocystis* spp. (52%) dans la population psychiatrique en comparaison avec un groupe témoin (1,6%) (34).

## 4. PATHOGENICITE

A ce jour, la pathogénicité *Blastocystis* spp. reste énigmatique. La question sur le caractère commensal, opportuniste ou pathogène du parasite reste ouverte.

La plupart des études évoquent le manque d'association entre la présence de *Blastocystis* spp. et la présence de symptômes voire une prévalence plus élevée chez les patients asymptomatiques (20). Cependant, les signes cliniques d'infections parasitaires sont souvent multifactoriels et sont influencés par les facteurs liés à l'hôte et au parasite, c'est pourquoi de nombreuses études sont biaisées par le manque de renseignements cliniques et biologiques et ne reflètent pas réellement la pathogénicité du parasite (20).

### 4.1 Troubles digestifs

La plupart des manifestations cliniques attribuées au *Blastocystis* spp. énumérées dans le tableau 2, sont non spécifiques et comprennent principalement des désordres intestinaux tels que nausées, douleurs abdominales, flatulences, diarrhées aiguës ou chroniques, anorexies (52). Ces troubles sont d'intensité variable pouvant s'exprimer de la simple diarrhée jusqu'à la gastro-entérite (1). Des études relient l'intensité des symptômes à la densité parasitaire (52), ou bien à la présence d'un sous-type en particulier (53). Cependant, il est nécessaire de s'appuyer sur des études expérimentales pour pouvoir confirmer ces corrélations.



| Symptoms            | Patients<br>(n=52) |    |
|---------------------|--------------------|----|
|                     | %                  | n  |
| Intestinal symptoms | 88.4               | 46 |
| Abdominal pain      | 76.9               | 40 |
| Diarrhoea           | 50                 | 26 |
| Distantion          | 32.6               | 17 |
| Urticaria           | 5.7                | 3  |
| Perianal pruritus   | 5.7                | 3  |
| Constipation        | 3.8                | 2  |
| Loss of weight      | 3.8                | 2  |

Tableau 2 : fréquence des symptômes chez des patients porteurs de *Blastocystis spp.* (52)

Aucun rapport n'implique le parasite dans un syndrome dysentérique (1). Il apparait généralement comme non-invasif comme l'ont démontrées les études expérimentales par endoscopie et histologie menées sur des animaux infectés (1). Toutefois, une étude a mis en évidence la présence de leucocytes dans les selles, suggérant une inflammation locale, c'est pourquoi cet organisme est souvent corrélé à une pathologie digestive, le syndrome du colon irritable (Irritable Bowel Disease IBD) entraînant une diarrhée inflammatoire et des douleurs abdominales (1, 53, 54) mais cette théorie est controversée par certains auteurs (55).

## 4.2 Manifestations allergiques

Ce parasite serait aussi associé à des lésions cutanées allergiques de type urticaire. Plusieurs cas ont été rapportés. Vogelberg *et al.* décrivent l'histoire d'un adulte de vingt ans présentant des signes digestifs spontanément résolutifs au retour d'un voyage (56). Ce patient a présenté une urticaire généralisée résistant aux antihistaminiques. L'examen parasitologique des selles s'est révélé positif à trois reprises à *Blastocystis spp.*, ST2 ayant été retrouvé dans ses selles. Malgré l'existence d'un biais sur la relation entre l'urticaire et la présence du parasite puisque le patient possédait un terrain allergique, l'instauration d'un traitement antiparasitaire a éradiqué les troubles observés.

Une étude plus complète, prospective, avec un recrutement strict, détaillé dans le tableau 3, de 54 patients atteints d'urticaire aiguë et chronique a été menée par Hameed *et al.* en 2011 (57), et confirme l'association de l'urticaire à la prévalence élevée de *Blastocystis* spp. : 61,1% versus 8% pour le groupe témoin. De surcroît, les résultats obtenus après traitement par Métronidazole FLAGYL®, médicament antiparasitaire utilisée pour *Blastocystis* spp. sont parlants : 60% des patients après une première cure et 100% après une deuxième cure ne présenteraient plus aucun symptôme et auraient un examen parasitologique des selles négatif permettant ainsi de faire le lien entre la présence de ce parasite et les manifestations cutanées urticariennes. De plus, ces auteurs associent la présence de la forme amiboïde, après culture *in vitro*, aux patients atteints d'urticaire (31% versus 0% groupe témoin) et démontrent que les patients présentant une symptomatologie digestive associée à une urticaire possède dans 95,2% la forme amiboïde de *Blastocystis* spp. dans les selles contre 0% du groupe témoin. ST3 est le seul incriminé. Cette relation entre urticaire et forme amiboïde a déjà été citée par Katsarou-Katsari *et al.* en 2008 qui retrouve le même sous-type (58).

Recrutement de l'étude menée par Hameed *et al.* en 2011

Tous les patients présentant au moins un de ces critères sont exclus :

- Historique d'allergie
- Prise de drogue deux semaines avant l'apparition des lésions
- Fébrile
- Présentant des arthralgies
- Des piqûres d'insectes
- Ayant des animaux
- Ayant voyagés récemment

Un dossier médical complet a été réalisé :

- Pathologie hépatique, rénale, maladies auto-immunes et endocriniennes.

Les parasites autres que *Blastocystis* spp. retrouvés dans les selles et les urines sont exclus.

*Tableau 3: conditions de recrutement de l'étude de Hameed et al. (57)*

### 4.3 Virulence des sous-types

Au vue de sa diversité génétique, il est légitime de se demander si la pathogénicité ne serait pas liée à des sous-types particulier (43). Clark *et al.* en

1997, étaient les premiers à évoquer l'éventuelle corrélation entre le pouvoir pathogène et le sous-type du parasite (11).

#### 4.3.1 Troubles digestifs

- ST1 est fréquemment associé à la présence de symptômes digestifs chez les patients porteurs de *Blastocystis* spp. (43, 59, 60). Ces observations sont corroborées par l'étude menée par Hussein *et al.* (61) qui mettent en avant la virulence de ST1 chez des rats infectés.

- La relation entre ST2 et la présence de symptômes est citée dans certaines études (43, 59, 60) mais la virulence n'est pas retrouvée *in vitro* chez les modèles animaux (61).

- ST3 ne paraît pas avoir de virulence à tropisme digestif (58, 59)

- Le pouvoir pathogène de ST4 serait aléatoire (58, 60).

A l'inverse, certaines études montreraient que la présence de signes digestifs n'est pas liée à un sous-type particulier (tableau 4) (13, 37, 62).

| Patients        | nombre de souches | ST1 | ST2 | ST3 | ST4 | ST7 |
|-----------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| symptomatiques  | 19                | 4   | 1   | 4   | 3   | 1   |
| asymptomatiques | 12                | 2   | 1   | 5   | 2   | 1   |

Tableau 4: génotypage des souches présentes chez des patients présentant ou non une symptomatologie digestive (37)

#### 4.3.2 Manifestations allergiques

- Malgré l'absence de manifestations digestives associées à ST3, il est fréquemment isolé chez les patients atteints de manifestations allergiques cutanées (57, 58).

- ST2 a été retrouvé chez un patient présentant des troubles digestifs associés à une urticaire.

La symptomatologie provoquée par le parasite n'est pas totalement corrélée à un sous-type particulier ; elle serait liée aux facteurs environnementaux, au parasite lui-même (réservoir animal) et aux facteurs de risque (43).

#### 4.4 *Blastocystis* spp. : pathogène ou pas ?

Il n'a pas été démontré de pathogénicité évidente de *Blastocystis* spp., c'est pourquoi il n'est pas possible, pour l'instant, d'appliquer les postulats de Koch permettant d'établir une relation de cause à effet entre un agent pathogène et une maladie (tableau 5) (63). Par principe de précaution, toute infection aiguë ou chronique dont les autres étiologies infectieuses ou non ont été exclues, devrait être traitée.

| Postulats de Koch         |  |
|---------------------------|--|
| 1 <sup>er</sup> Postulat  | Le micro-organisme doit être retrouvé en abondance chez tous les individus atteints de la maladie, mais pas chez les individus sains.          |
| 2 <sup>ème</sup> Postulat | Le micro-organisme doit pouvoir être isolé à partir d'un individu malade et cultivé en culture pure.   |
| 3 <sup>ème</sup> Postulat | Le micro-organisme mis en culture doit reproduire la maladie une fois inoculé à un individu sain.  |
| 4 <sup>ème</sup> Postulat | Le micro-organisme doit être isolé à nouveau à partir du malade infecté expérimentalement et doit être identique à l'agent pathogène original. |

Tableau 5: Postulats de Koch (63)

Nous pouvons également citer l'exemple d'un autre parasite, *Giardia duodenalis*, considéré comme pathogène mais qui dans certains cas (âge, statuts immunitaire et nutritionnel du patient et génotypes particuliers de la souche) n'entraîne pas de signe clinique. L'infection peut être spontanément résolutive (24, 64).

## 5. PHYSIOPATHOLOGIE

La compréhension de la physiopathologie nécessite d'autres études notamment sur des modèles animaux transposables à l'homme ce qui jusqu'à présent était rare voire absent. Des publications récentes suggèrent comme bons candidats les rats et les poulets comme modèles expérimentaux (1, 65), néanmoins, grâce aux techniques de culture *in vitro*, quelques aspects de la physiopathologie ont pu être déterminés.

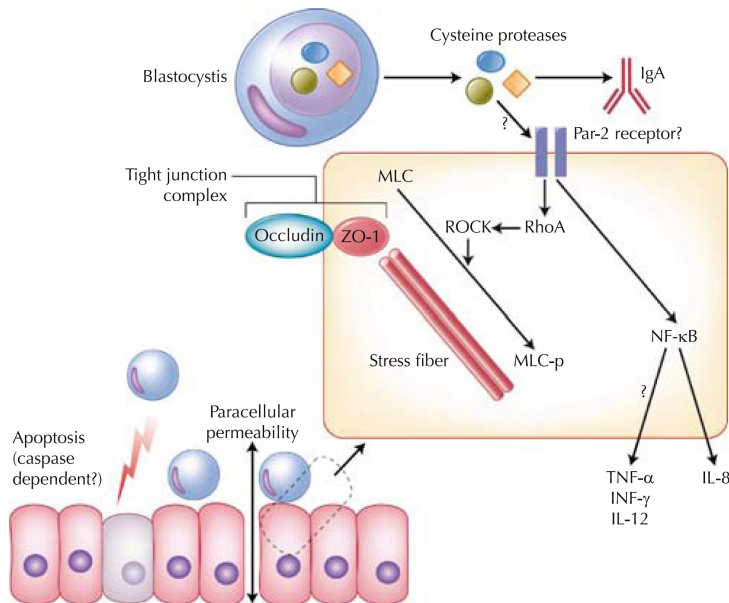
- troubles digestifs : comme nous l'avons dit précédemment, le manque de modèle animal reproductible chez l'homme freine la compréhension de cet énigmatique organisme. Certaines études attribuent le pouvoir pathogène du parasite à sa capacité d'altérer la barrière épithéliale de l'hôte (20, 24). L'incubation du *Blastocystis* spp. avec des cellules épithéliales cultivées entraîne une augmentation de la perméabilité de l'épithélium et la contraction musculaire de la cellule par le complexe des jonctions serrées (figure 12) (20).

Long *et al.* observent qu'après 24 heures d'incubation, *Blastocystis* spp. augmente significativement le taux d'**interleukine 8** (IL-8) et de facteurs de croissance Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (**GM-CSF**), chimioattractif pour les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (66). IL-8 est une chémokine entraînant aussi le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles sur le site de l'inflammation et activant les monocytes. Elle joue un rôle essentiel dans les pathologies inflammatoires. Or, après 6 heures d'incubation, l'IL-8 n'augmente pas, le taux est même diminué en présence d'*Escherichia coli* et du lipopolysaccharide bactérien. Ces observations suggèrent que *Blastocystis* spp. dans sa première phase d'invasion régule négativement la réaction immunitaire pour pouvoir survivre et facilite indirectement la multiplication d'autres pathogènes opportunistes. Ce mécanisme d'invasion est assez commun aux parasites et a été démontré chez *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum* (1) ; de plus, il est décrit que *Blastocystis* spp. possède des enzymes, les **cystéines protéases**, capables de dégrader les IgA sécrétées humaines, acteurs principaux de la défense des cellules intestinales. L'équipe menée par Puthia *et al.* a observé que les lysats cellulaires du parasite et les sécrétions de ST4 et ST7 contenaient des protéases anti-IgA (24). Au niveau des cellules épithéliales humaines, les cystéines protéases de ST4 induiraient aussi par la cascade du facteur de transcription Nuclear Factor- $\kappa$ B-dependent (NF- $\kappa$ B), la production d'IL-8 pro-inflammatoires, montrant pour la première fois le rôle pro-inflammatoire des cystéines protéases du parasite. Son expression est régulée par de nombreuses voies mais la plus importante est l'activation de NF- $\kappa$ B. De nombreux pathogènes, comme *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* et *Bacteroides fragilis* induisent la production d'IL-8 chez l'hôte par cette voie. D'une manière générale, les cystéines protéases sont connues pour moduler l'activité des récepteurs aux protéases-activées PAR (Protease-Activated Receptors) retrouvés sur la surface des cellules

épithéliales en réponse à des signaux pro inflammatoires. L'augmentation de l'activité protéasique fécale par les récepteurs PAR-2 est décrite dans le syndrome du côlon irritable, associé fréquemment à la présence de *Blastocystis* spp. (20). Il est donc possible que les protéases de ce parasite modulent l'activité de ces récepteur PAR.

Au même titre que la forme pathogène *Entamoeba histolytica* montre une activité cystéine protéase 10 à 1000 fois plus importante que la forme non pathogène *Entamoeba dispar*, Mirza et Tan ont observé que les cellules en contact avec ST7 montraient une activité cystéine protéase supérieure à celle en contact avec ST4, suggérant une virulence supérieure au sous-type 7 (67).

Voici un schéma récapitulant la physiopathologie probable du *Blastocystis* spp. (figure 12) :



*Tight junction complex* : complexe des jonctions serrées

*MLC* : myosin light-chain kinase

*Stress fiber* : fibre de stress

*NF-κB* : nuclear factor-κB

*PAR-2* : protease activated récepteur type 2

*RhoA* : Rho-GTPase family member A

*ROCK* : Rho-associated kinase

*ZO-1* : zona occludens-1

*TNF-α et INF-γ* : tumor necrosis factor –α et interferon – γ

*Figure 12: physiopathologie probable de Blastocystis spp. au sein de la muqueuse intestinale (20)*

- Troubles cutanés (1, 20) : la possible présence d'antigènes incluant les carbohydrates présents sur le manteau de surface entourant la forme amiboïde,

engendrerait un recrutement des cellules inflammatoires et la libération de substances activatrices d'histamine relarguée par les mastocytes et basophiles à l'origine des troubles cutanés observés. L'interaction de ces mastocytes avec les lymphocytes T helper 2 produirait des IL-3, IL-4, IL-5 et IL-13 permettant la réponse immunitaire allergique typique via les IgE. Ces immunoglobulines joueraient donc un rôle dans l'urticaire par l'activation des mastocytes puis leurs dégranulations entraînant une libération de médiateurs de l'inflammation. Il a été aussi suggéré que les molécules du parasite activent la voie du complément et entraînent la production anaphylatoxine C3a et C5a.

L'identification de ces IgE spécifiques du parasite chez les patients atteints d'urticaires serait d'une aide précieuse pour définir le mécanisme sur la cause de ces lésions.

## 6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le pouvoir pathogène incertain du parasite décourage les cliniciens à le considérer comme agent étiologique de la maladie. Le diagnostic repose principalement sur l'Examen Parasitologique des Selles (EPS) fraîchement émises. Sa détection est difficile en raison de son polymorphisme et de sa concentration fluctuante dans les selles (26).

### 6.1 Diagnostic direct

#### 6.1.1 L'EPS (68)

L'EPS est souvent prescrit à la recherche d'étiologies parasitaires autres que le *Blastocystis* spp. dans des situations cliniques particulières telles que diarrhée aiguë persistant plus de 3 jours malgré un traitement symptomatique, avec recherche de *Giardia intestinalis*, diarrhée persistante (2 semaines) ou chronique (durant plus de quatre semaines), douleurs abdominales, troubles digestifs divers (anorexie, boulimie, nausées, dyspepsie, ténesme, prurit anal), hyperéosinophilie.

Il est essentiel de connaître non seulement l'origine géographique du patient mais aussi la notion d'éventuels voyages à l'étranger car suivant la localisation, nous ne recherchons pas les mêmes parasites.

### 6.1.1.1 Principe

L'EPS est composé d'un examen macroscopique, d'un examen microscopique direct et après concentration permettant ainsi de déceler d'éventuelles parasites en quantité trop faible à l'examen direct.

- Examen macroscopique : il consiste à noter la consistante, la couleur, la présence de sang, de glaire et la présence éventuelle de parasites visibles à l'œil nu (oxyures adultes, anneaux de *Taenia*).

- Examen microscopique à l'état frais (examen direct) : il nous renseigne sur la présence éventuelle de formes végétatives de protozoaires mais aussi s'ils sont présents en grande quantité de kystes de protozoaires, de larves et œufs d'helminthes. On note la présence d'hématies, de leucocytes ou de cristaux de Charcot-Leyden (signe d'une hyperéosinophilie locale). En pratique, un échantillon de selles fraîches est déposé entre lame et lamelle dans une goutte de solution isotonique de NaCl et observé en microscopie optique à l'objectif 10 puis 40.

- Examen microscopique après coloration : un échantillon de selles fraîches est déposé entre lame et lamelle dans une goutte de colorant, ici le lugol, et observé en microscopie optique à l'objectif 10 puis 40. Cette coloration permet de mettre en évidence certains détails des parasites notamment les vacuoles iodophiles intracytoplasmiques colorées en brun acajou et les membranes nucléaires. Elle permet d'étudier la digestion des féculents : l'amidon mal digéré se colore en bleu violet noir ; l'amidon bien digéré en rose. En cas d'interprétation difficile, il est possible de réaliser une coloration au Merthiolate-Iode-Formol (MIF) permettant de colorer la membrane nucléaire en rouge foncé et le cytoplasme en rouge.

- Examen microscopique après concentration : la méthode utilisée est une méthode diphasique mise au point à Bordeaux par Bailenger en 1963 appelée technique de Bailenger. Elle est simple, rapide et efficace pour mettre en évidence un grand nombre de parasites sous forme d'œufs, larves ou kystes. Par contre, elle détruit les formes fragiles comme les formes végétatives d'amibes (69). Elle consiste à dissoudre ou garder en suspension certains résidus fécaux tout en précipitant les œufs ou kystes de parasites sous l'influence de la centrifugation.



Deux phases non miscibles, l'une aqueuse (tampon acéto-acétique), l'autre lipophile (éther), sont mises en présence, permettant la réalisation d'un coefficient de partage dont la valeur est conditionnée pour chaque particule fécale par sa balance hydrophile / lipophile. Les débris sont présents entre les deux phases tandis que les parasites se concentrent dans le sédiment (culot d'enrichissement) et comme le montre la figure 13.

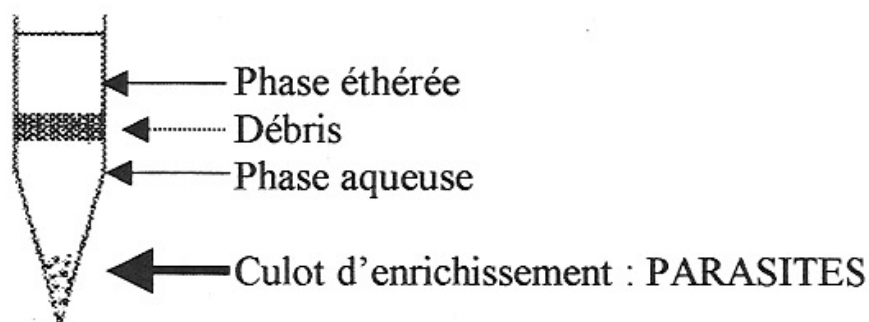


Figure 13 : mise en évidence des quatre phases obtenues après concentration par la technique de Bailenger

#### 6.1.1.2 *Blastocystis* spp. et EPS

Le polymorphisme de cet organisme rend sa détection difficile à l'état frais et peut prêter à confusion avec des levures, des globules blancs, des globules graisseux ou encore *Cyclospora* sp. ; en effet, comme nous l'avons dit précédemment, *Blastocystis* spp. existe sous quatre formes prédominantes : vacuolaire, granulaire, amiboïde et kystique. Les formes les plus fréquemment retrouvées dans les selles sont les formes vacuolaire et kystique.

De taille hétérogène, la forme vacuolaire est difficile à identifier c'est pourquoi sa détection nécessite un œil « avisé ». Certaines colorations permettent d'augmenter la sensibilité de l'examen direct comme la coloration au lugol citée précédemment qui permet de colorer sa vacuole. La coloration peut se faire aussi à l'hématoxyline-éosine, au giemsa, à la coloration de GRAM ou encore au trichrome (1, 7). La plus utilisée est celle au trichrome décrite dans de nombreuses publications de meilleure sensibilité que l'examen direct simple (70). Cependant, les formes vacuolaires ne sont pas retrouvées à la concentration car elles sont lysées.

En raison de leurs petites tailles, les formes kystiques sont très rarement retrouvées en routine dans les selles même après concentration en raison de la

difficulté d'identification. Cependant, une autre technique de concentration est fréquemment décrite, c'est la technique de Concentration par le Formol Ethylacétate (FECT) appelée encore méthode de Ritchie (71).

Une étude menée par Stensvold *et al.* a mis en parallèle les différentes méthodes de diagnostic direct utilisées dans la recherche de *Blastocystis* spp. dans les selles et il s'avère que la technique FECT a non seulement une sensibilité médiocre de 50% mais aussi présente des faux-négatifs pour ST3 (17). Une autre étude ne met pas en évidence de différences significatives entre la coloration au trichrome et la culture (70).

### 6.1.2 La culture *in vitro*

Largement employée à des fins expérimentales, elle peut s'avérer utile dans le diagnostic car elle présente l'avantage d'amplifier le plus grand nombre de parasites, rendant la détection plus aisée. L'inconvénient majeur est la lenteur de certains sous-types à pousser notamment ST7 qui nécessite une température d'incubation élevée. Il est même conseillé pour une meilleure approche diagnostique en terme de spécificité et de sensibilité de combiner cette technique à la microscopie optique (1) ; cependant en routine, la **microscopie optique** reste **la méthode de choix** pour identifier les parasites dans les selles (15).

### 6.1.3 Détection de l'ADN génomique de *Blastocystis* spp.

Les techniques basées sur la détection de l'ADN sont les méthodes les plus sensibles et les seules permettant de différencier les différents sous-types de *Blastocystis* spp. (17). Divers marqueurs moléculaires ont été utilisés :

- Les séquences ciblées (Séquence-Tagged Sites STS) : ce sont des séquences uniques, spécifiques, qui détectent la variation allélique dans l'ADN génomique permettant ainsi le typage du *Blastocystis* spp. (13). Cette technique a l'avantage de détecter les coinfections (1).

- Le facteur d'élongation 1-alpha.

L'analyse de l'ARN ribosomique 18S reste le marqueur moléculaire de choix pour identifier et établir le sous-type du parasite ; cependant, une étude portant sur le ST7, a mis en évidence un important polymorphisme de ce gène, soulevant la difficulté d'établir un génotypage précis des souches de *Blastocystis*

spp.. Suite à cette observation, les auteurs de cette étude développent un nouveau marqueur épidémiologique basé sur l'ADN mitochondrial (72).

### 6.1.3.1 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

Dans les études épidémiologiques, l'analyse par RFLP est souvent utilisée (11, 73, 74). Elle est basée sur la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction qui le découpent en fonction des sites de restriction présents sur la petite sous-unité ribosomale. Selon les sous-types, un profil différent apparaît après migration de ses fragments. Cependant, cette technique connaît des limites dues au manque de standardisation de la méthode (grande variété d'amorces), à la présence éventuelle de mutations sur le site de restriction et à la difficulté d'interprétation des profils en cas de co-infections (1).

### 6.1.3.2 La PCR conventionnelle

#### 6.1.3.2.1 Principe

La PCR conventionnelle permet de cibler un segment d'ADN particulier dans le génome, puis de le recopier. Le principe, illustré par la figure 14, est simple, il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication, appelées cycle, à partir d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime (3') pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou « primers » en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

Avant la réaction, tous les « acteurs » de la PCR doivent être présents : l'ADN, les amorces pour cibler le segment voulu, l'enzyme permettant la réplication du brin d'ADN appelé ADN polymérase, et les quatre déoxyribonucléotides (dNTP) constitutifs de l'ADN (dCTP, dGTP, dATP, dTTP). Ce mélange ainsi réalisé est appelé mix.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur qui n'est autre qu'un bloc thermique dans lequel nous pouvons insérer les tubes contenant le mix de PCR. Il a pour fonction d'amener l'échantillon à des températures désirées pendant une durée programmée en effectuant des cycles. Le programme de PCR comprend une succession d'environ 35 cycles. Chaque cycle est divisé en trois phases avec

trois températures appliquées à des durées différentes : dénaturation, hybridation et élongation.

- La **dénaturation** consiste à rompre les liaisons faibles de la double hélice d'ADN pour donner 2 simples brins d'ADN. La température est en général de 95°C.

- L'**hybridation** repose sur le principe de l'appariement des amorces à la séquence d'ADN complémentaire. La température est forcément inférieure à celle de la dénaturation et dépend des amorces choisies. En effet, chaque amorce a une température de fusion propre appelée  $T_m$  qui correspond à la température où 50% de l'ADN est simple brin. Pour avoir une idée de la température d'hybridation, il faut soustraire 5 degrés à la  $T_m$  des amorces.

- Ces amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à l'**élongation** c'est-à-dire à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice par l'ADN polymérase. Elle se fait par ajouts successifs de dNTP à la température de 72°C.

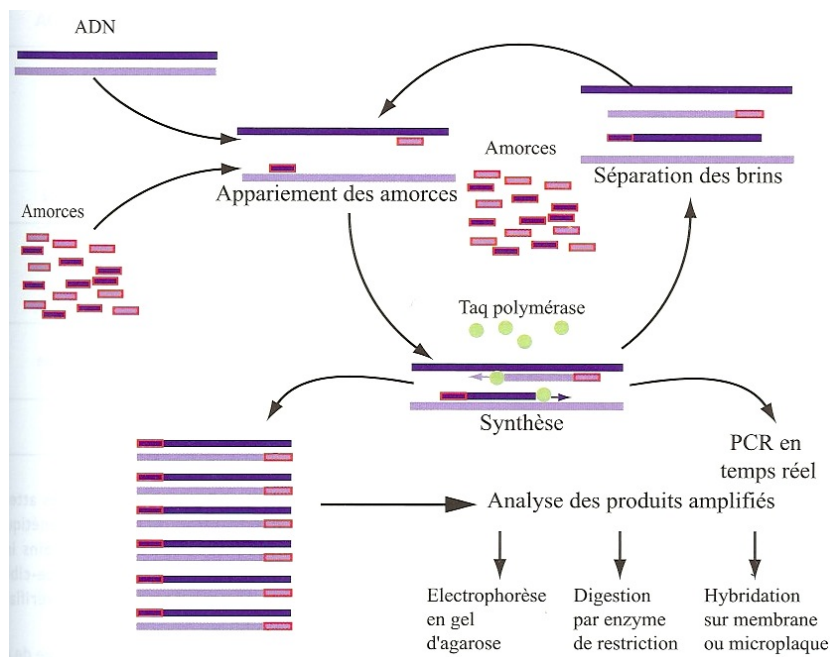


Figure 14: principe de la technique d'amplification en chaîne par polymérase ou PCR (73)

#### 6.1.3.2 Application de la PCR conventionnelle à la recherche de *Blastocystis* spp.

La détection de *Blastocystis* spp. par PCR conventionnelle directement à partir des échantillons de selle est aussi sensible que la culture xénique (17). C'est la technique la plus employée pour identifier le sous-type de *Blastocystis* spp. présent dans les selles (16, 41). Grâce à des amorces spécifiques de longueur variable suivant les publications correspondant au gène de l'ARN ribosomique 18S (annexe 2), cette technique va permettre l'identification du sous-type présent dans les selles.

#### 6.1.3.3 La PCR nichée (75)

Utilisée par Stensvold *et al.* (76), Termthurapoj *et al.* (70) et Soupart *et al.* (43), la PCR nichée est une méthode d'amplification au cours de laquelle le produit issu d'une première PCR est de nouveau amplifié à l'aide d'un second couple d'amorces qui s'hybride dans une partie interne des produits issus de la première amplification. Elle consiste à effectuer deux PCR successives.

#### 6.1.3.4 Le séquençage

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides sur les produits de PCR obtenus, comme par exemple sur l'ARN ribosomique 18S, permettant ainsi d'identifier le sous-type de *Blastocystis* spp. contenu dans l'échantillon.

##### 6.1.3.4.1 Méthode manuelle

La méthode la plus utilisée est la méthode Sanger. Le principe de cette technique repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase ayant la capacité de synthétiser un brin complémentaire à partir d'un brin matrice. La synthèse du brin complémentaire est initiée suite à la fixation d'une amorce spécifique du produit de PCR à analyser. Celui-ci, situé en amont de l'ADN à séquencer, permet l'élongation d'un nouveau brin complémentaire suite à l'incorporation aléatoire de dNTP en excès, et de didéoxynucléotides (ddNTP) en quantité limitante, s'incorporant que très rarement et au hasard. Les didéoxynucléotides (ddNTP) diffèrent des dNTP par leur extrémité 3' où le groupement –OH est remplacé par –H. Cette modification empêche la liaison phosphodiester avec le nucléotide

suisant et interrompt l'allongement de la chaîne. A la fin de la réaction, le milieu est donc composé de fragments de toutes les tailles qui sont ensuite séparés par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide, en fonction de leurs masses moléculaires.

#### 6.1.3.4.2 Méthodes automatisées

##### 6.1.3.4.2.1 Adaptation de la méthode Sanger à la fluorescence

Les ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) sont chacun marqués par un fluorophore de couleur différente dont le spectre d'émission est spécifique. De ce fait, chaque fragment d'ADN synthétisé porte un fluorophore terminal appelé terminateur d'élongation (en anglais BigDye terminator). L'avantage de cette technique est qu'elle s'effectue en une seule réaction de séquençage avec un mélange réactionnel composé de :

|   |
|---|
| ADN matrice + enzyme + dNTP + ddATP + ddCTP + ddGTP + ddTTP |
|---|

Le mélange est ensuite injecté dans un séquenceur automatique. La migration des produits de PCR s'effectue par électrophorèse capillaire : les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur longueur par un champ électrique intense. Par un système de transfert d'énergie par résonance (FRET), le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à l'argon dont l'émission s'effectue à deux longueurs d'onde distinctes (488 nm et 514,5 nm). La fluorescence émise est captée par le fluorochrome accepteur qui va réémettre selon un spectre de fluorescence unique pour chaque ddNTP. Cette émission de fluorescence est captée par une cellule (camera Charge Couple Device CCD) et traitée informatiquement pour associer la base correspondante et ainsi définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Toutes ces étapes sont illustrées par les figures 15 et 16 (77).

Les chromatogrammes obtenus sont par la suite analysés à l'aide d'un logiciel tel que BIOEDIT v7.0.1 puis comparés aux séquences répertoriées (GenBank) dans la base de données, National Center for Biotechnology Information (NCBI), par l'interface BLAST (78).

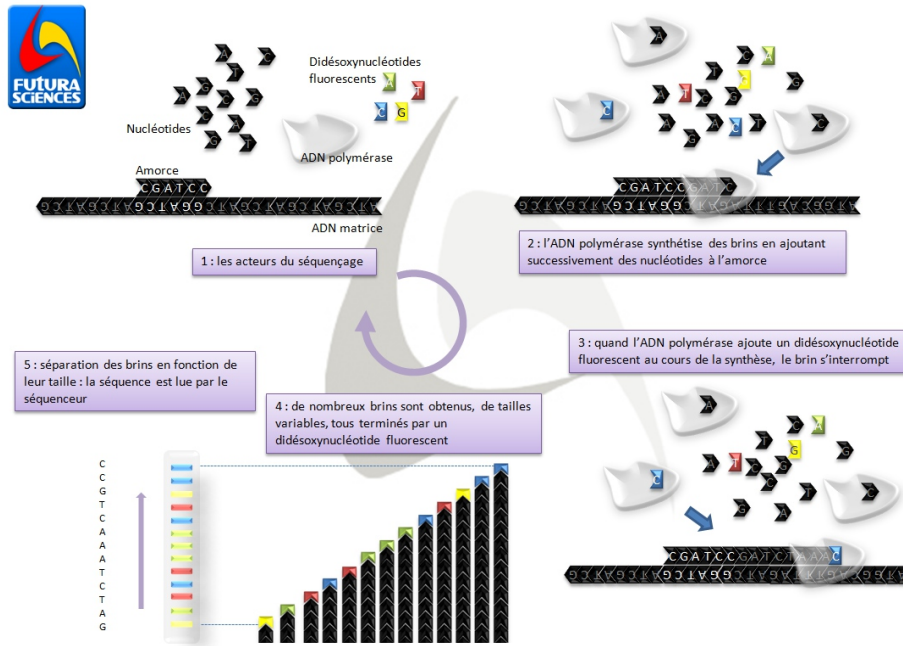


Figure 15: méthode Sanger adaptée à la fluorescence (77).

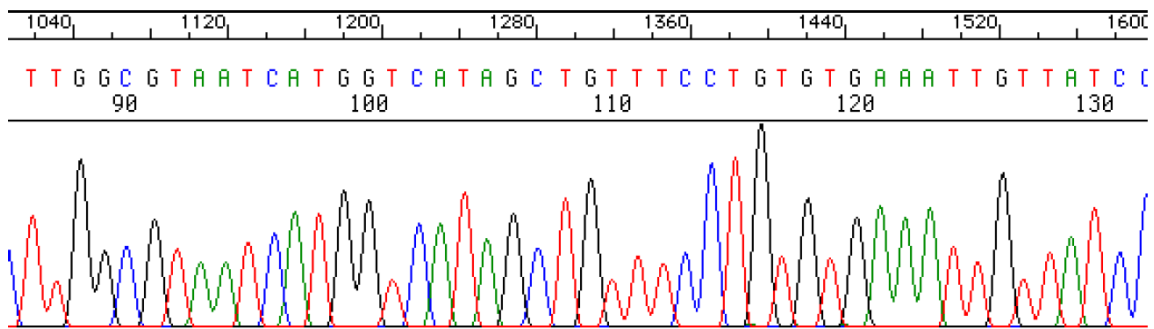


Figure 16: schéma général du séquençage selon la technique Big Dye terminator

#### 6.1.3.4.2.2 Le pyroséquençage

- Principe : il permet d'effectuer un séquençage rapide et à moindre coût qu'un séquençage par la méthode Sanger. Les nucléotides (sous-forme désoxyribonucléotide triphosphate-dNTP) sont ajoutés l'un après l'autre (et non pas tous ensemble comme dans la méthode Sanger). Si le nucléotide ajouté est complémentaire du nucléotide du brin matrice, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse et un pyrophosphate inorganique (PPi) est libéré. Le signal lumineux est capté par un capteur CCD et traduit par un pic sur le pyrogramme™

illustré par la figure 17. L'inconvénient de cette méthode est la limite de taille des fragments analysables (jusqu'à seulement 100 nucléotides).

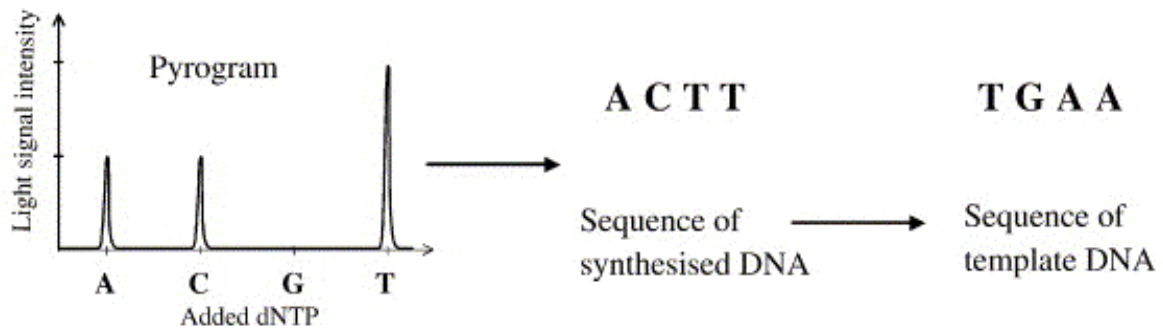


Figure 17: pyrogramme d'après Ahmadian et al. (79)

- Application au *Blastocystis* spp. : Stensvold *et al.* en 2006, ont réussi avec 40-44 paires de base à différencier 6 sous-types différents du parasite, les autres n'ayant pas été testés. Cette technologie semble être une bonne méthode de screening adaptée à une grande échelle de patients en raison de la rapidité et du faible coût, cependant d'autres études sont nécessaires notamment pour tester les autres sous-types de *Blastocystis* spp. (80).

### 6.1.3.5 Le clonage

Un problème commun aux deux techniques est la difficulté de détection des coinfections. Une possibilité pour différencier les différents sous-types présents est d'effectuer un clonage c'est à dire d'insérer les produits de PCR obtenus dans un plasmide et de l'amplifier par une bactérie ultra compétente. Les différents clones obtenus, environ une dizaine par patient, sont ensuite séquencés puis comparés à la même banque de données (41).

### 6.1.3.6 La PCR en temps réel

#### 6.1.3.6.1 Principe

La PCR en temps réel utilise le principe de la PCR conventionnelle par l'amplification cyclique d'un fragment d'ADN sauf qu'à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Il existe principalement deux groupes permettant la détection ou la quantification de ce signal en temps réel : les systèmes utilisant les sondes d'hybridation (que



nous n'aborderons pas ici) et les agents intercalants. Très peu toxique, Le SYBR®green est l'agent intercalant le plus fréquemment utilisé en PCR en temps réel ; il est capable de se lier à l'ADN double brin. Au cours de l'hybridation des amorces, puis de l'extension réalisée par l'ADN polymérase, il s'intercale entre les deux brins d'ADN nouvellement synthétisés et émet une fluorescence. Cette émission de fluorescence décroît complètement, à l'étape de dénaturation du cycle suivant. En soumettant les amplicons à une température allant de 70°C à 90°C, il est possible de mesurer la variation de fluorescence en fonction de la température et donc de déterminer la température de fusion des amplicons appelée  $T_m$ . Cette température de fusion correspondant à la température pour laquelle 50% des molécules d'ADN sont désappariées, est propre à chaque sous-type considéré. Par conséquent, la différenciation des sous-types de *Blastocystis* spp. est envisageable.

#### 6.1.3.6.2 PCR en temps réel et *Blastocystis* spp.

En 2008, Jones *et al.* ont mis au point une technique de PCR en temps réel testée sur trois sous-types différents. Une étude menée par Poirier *et al.* en 2011 a permis d'établir les courbes de fusion pour les 9 sous-types de *Blastocystis* spp. avec la technique SYBR®green (figure 18) (38).

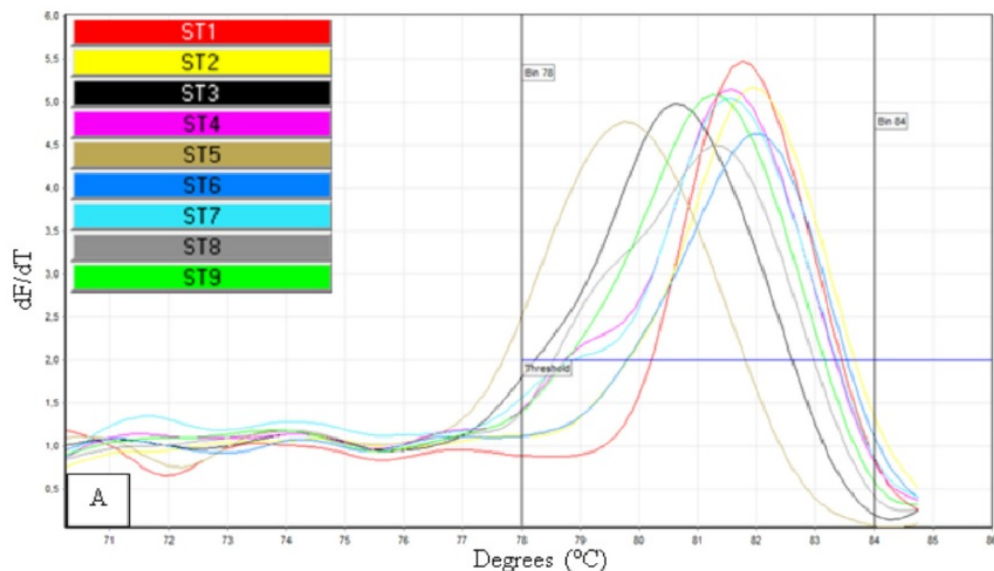


Figure 18: courbes de fusion des neuf sous-types de *Blastocystis* spp. par PCR en temps réel (38)

## 6.2 Diagnostic indirect

La présence du parasite entraîne une réponse immunitaire humorale par production d'immunoglobulines G, A et M (IgG, IgA et IgM) anti-*Blastocystis* spp., détectées par dosage immunologique (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA et immunofluorescence indirect Assay IFA) (1, 81).

Dans une étude menée par Zierdt *et al.* en 1995, en ELISA, des taux d'IgG allant de 1/50 à 1/1600 ont été retrouvés chez des patients symptomatiques. Tous les sérums du groupe témoin montraient un taux d'IgG inférieur à 1/50 (81).

Kaneda *et al.* ont observé que les patients asymptomatiques possédaient eux aussi des anticorps mais à de faibles titres allant de 0 à 1/60 (82). Ils suggèrent aussi qu'une infection chronique entraîne un taux plus élevé d'anticorps.

Une étude menée par Hussain *et al.* a permis de faire le rapprochement entre la présence de titres élevés en IgG anti-*Blastocystis* spp., notamment la sous-classe des IgG2, et le syndrome du côlon irritable (83). En effet, ils expliquent que les IgG2 sont probablement synthétisées en réponse à la stimulation antigénique provoquée par le parasite via son manteau de surface. D'ailleurs cette structure spécifique au *Blastocystis* spp. n'engendrerait pas de réaction croisée avec d'autres parasites notamment *Entamoeba histolytica*. L'élément paradoxal de cette étude est l'absence dans 40 % des cas de *Blastocystis* spp. dans les selles après culture. Ces résultats pourraient s'expliquer par un traitement préalable antiparasitaire avant l'inclusion dans l'étude car 85% des patients de l'étude ont eu une histoire de traitement avant leur venue à l'hôpital.

C'est en 2009 que Santos et Rivera ont travaillé sur la cinétique des anticorps anti-*Blastocystis* spp. de types IgG, IgA et IgM chez la souris infectée oralement par ce parasite dans le sérum ainsi que dans les sécrétions intestinales sur plusieurs semaines (84). Les résultats confirment qu'une réponse humorale se met en place rapidement puisque le taux d'IgM croit dès le début de l'immunisation (signant alors une infection récente) et ce jusqu'à la 3<sup>ème</sup> semaine dans le sérum. Ensuite le taux reste stable les 2 semaines suivantes avant de décroître fortement. Les taux sériques d'IgG et d'IgA ne sont pas significativement différents jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine où les IgG ont un taux supérieur aux IgA. La

cinétique des anticorps sériques débiterait donc par la production immédiate d'IgM suivie par des IgG et IgA.

Dans les sécrétions intestinales, il apparaît que les IgA prédominent avec un taux plus élevé les dernières semaines mis à part au début où le taux d'IgG est le plus élevé puis diminuent progressivement jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine pour de nouveau augmenter. Les taux les plus bas sont retrouvés pour les IgM même si sa cinétique traduit une augmentation les deux premières semaines puis une décroissance du taux jusqu'à la fin de l'expérience.

Toutes ces observations vont dans le sens où les IgG et IgM sont plutôt présents dans la circulation sanguine avec les IgG comme isotype prédominant, et les IgA au niveau des muqueuses intestinales. En effet, les IgA sécrétoires ont une action locale et permettent de protéger la muqueuse par inhibition de l'adhérence et de l'invasion de pathogène. Santos et Rivera justifient le fort taux initial d'IgG dans les sécrétions intestinales par une production locale qui serait due à des cellules localisées au niveau de la *lamina propria*. Ces résultats sont issus de modèles murins et seraient transposables à l'homme.

Une étude récente traite du profil protéique des différentes souches du parasite retrouvées dans une population symptomatique et asymptomatique, et du caractère immunogène de celles-ci (85). Il est observé d'une part des similitudes antigéniques et d'autre part des bandes antigéniques distinctes, surtout dans les bas et hauts poids moléculaires. Ces résultats corroborent les observations d'Hégazy *et al.* et Lanuza *et al.* (86, 87). L'analyse par immunoblot, appelée aussi western-blot, permet de révéler la présence ou non d'anticorps IgG dirigés contre les différentes protéines de *Blastocystis* spp. retrouvées sur le profil protéique. Cette technique consiste à fixer par électrotransfert sur la surface d'une bandelette de nitrocellulose, les antigènes préalablement séparés par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide. En présence du sérum, les anticorps anti-*Blastocystis* spp. présents dans l'échantillon vont se fixer spécifiquement sur les antigènes de la bandelette. Les résultats, détaillés dans le tableau 6, révèlent que la protéine de 29 kilodalton (kDa) est la plus fréquemment retrouvée dans le sérum des patients symptomatiques, avec 40% des cas contre seulement 5% dans le sérum des patients asymptomatiques. Cette conclusion est en accord avec les observations de Tan *et al.* (88) qui associent cette protéine de 29 kDa à

la protéine mAb 1D5 localisée sur la membrane plasmique du parasite. Aucune réaction croisée n'est retrouvée avec d'autres parasites comme *E. histolytica*, *Giardia duodenalis* et *Trichomonas vaginalis* et surtout elle serait détectée uniquement chez l'homme.

| PM des bandes (kD) | Patients symptomatiques <i>Blastocystis</i> spp. + N (%) | Patients asymptomatiques <i>Blastocystis</i> spp. + N (%) | Différence significative |
|--------------------|--|---|--------------------------|
| 100                | 2 (10)   | 0 (0)   | Non                      |
| 64                 | 5 (25)   | 0 (0)   | Oui                      |
| 56                 | 6 (30)   | 2 (10)  | Oui                      |
| 45                 | 3 (15)   | 2 (10)  | Non                      |
| 38                 | 4 (20)   | 0 (0)   | Oui                      |
| 32                 | 1 (5)  | 0 (0)   | Non                      |
| 29                 | 8 (40)   | 1 (5)   | Oui                      |
| 20                 | 6 (30)   | 1 (5)   | Non                      |
| 18                 | 2 (10)   | 0 (0)   | Non                      |

Tableau 6: poids moléculaires (PM) et fréquences des bandes antigéniques d'un pool de patients symptomatiques avec les sérums de patients symptomatiques ou non (85)

La découverte de cette protéine de 29kDa est encourageante et pourra peut-être un jour permettre la détection des anticorps dirigés contre cette protéine à des fins diagnostiques et établir la différenciation entre les patients symptomatiques et asymptomatiques. Mais le rôle de cette protéine immunogène n'est pas encore établi et il est nécessaire de le déterminer pour une meilleure compréhension de sa pathogénicité ainsi que pour envisager un futur diagnostic sérologique en routine par le développement d'un kit commercial, sensible et spécifique.

## 7. TRAITEMENT

En raison de la pathogénicité controversée, un traitement est généralement prescrit lorsque toutes les autres étiologies ont été exclues (20).

### 7.1 Le métronidazole FLAGYL®

Le **métronidazole FLAGYL®** est le médicament de choix pour l'éradication de ce parasite (20). A la fois antibiotique et antiparasitaire (utilisé contre *giardia*

*duodenalis*, *E. histolytica*, *trichomonas vaginalis*), ce dérivé 5-nitro-imidazolé est connu pour son action contre les organismes anaérobies. Il agit en quatre phases, d'abord en diffusant à l'intérieur du parasite, puis son groupement nitro est réduit entraînant un effet cytotoxique par inhibition de la synthèse d'ADN traduit par la mort cellulaire. Les produits du métabolisme sont ensuite libérés sous forme inactive (89). Puthia *et al.* ont observé que le métronidazole permettrait aussi, de réduire la production d'IL-8, importante chez le rat infesté par *Blastocystis* spp. (24).

Le tableau 7 illustre le schéma posologique à adopter chez l'adulte et l'enfant ; la durée standard du traitement étant généralement de 10 jours. Les effets indésirables sont minimes : saveur métallique dans la bouche, coloration rouge-brunâtre des urines, effet antabuse, troubles digestif bénins. Il est déconseillé au premier trimestre de la grossesse et pendant l'allaitement et contre-indiqué en cas d'hypersensibilité aux imidazolés ou à l'un des excipients, en cas de traitement concomitant par disulfirame et en cas de porphyrie hépatique.

|                          | Dose adulte   | Dose pédiatrique   |
|--------------------------|---|--|
| Métronidazole<br>FLAGYL® | 750 mg 3x par jour pendant 10 jours<br>500 mg 3x par jour pendant 10 jours<br>1,5 g en une prise/ jour pendant 10 jours | 15 mg/kg/j pendant 7 jours<br>20-30 mg/kg/j pendant 10 jours |

Tableau 7 : posologie du traitement par FLAGYL® (20)

De nombreuses études ont montré l'efficacité du FLAGYL® sur les signes cliniques et sur l'éradication du *Blastocystis* spp. dans les selles (90, 91) ; ceci étant, il a aussi été décrit des cas de résistance à cet antiparasitaire liés probablement à des souches de sensibilités différentes (92-94). Cette variabilité de réponse clinico-biologique a été explorée par Mirza *et al.* (93) dans le cadre d'une étude *in vitro* comparant les sensibilités de différentes molécules, notamment le métronidazole, à deux sous-types : ST4 et ST7. Il apparaît que ST7 est naturellement résistant au FLAGYL® et que ST4 a une sensibilité variable à cette molécule. Il serait intéressant d'élargir l'étude de la sensibilité aux autres sous-types du parasite.

D'autres dérivés nitroimidazolés peuvent être utilisés, notamment le tinidazole FASIGYNE<sup>®</sup> et l'ornidazole. Cependant, il existe des résistances croisées avec le métronidazole déjà rapportées pour d'autres parasites (93).

## 7.2 Le cotrimoxazole BACTRIM<sup>®</sup>

Le **cotrimoxazole BACTRIM<sup>®</sup>** lui aussi efficace est une alternative thérapeutique en cas de résistance au FLAGYL<sup>®</sup> (95). Cette bithérapie est commercialisée avec un ratio triméthoprim : sulfaméthoxazole de 1/5. Or Mirza *et al.* ont aussi étudié la réponse thérapeutique avec un ratio 1/2 et suggèrent que ce ratio permettrait d'augmenter l'efficacité de ce traitement (93). Néanmoins, une étude menée par Moghaddam *et al.* émet plus de retenue quant à l'utilisation du BACTRIM<sup>®</sup> comme thérapeutique en raison du faible pourcentage d'éradication du parasite trouvé dans son étude, évalué à 22% (1, 91).

## 7.3 Le nitazoxanide

Le **nitazoxanide**, utilisé dans diverses parasitoses (notamment pour le traitement de la cryptosporidiose en autorisation temporaire d'utilisation) semblerait avoir une nette efficacité contre *Blastocystis* spp. avec une réponse clinico-biologique de 86% contre le groupe placebo qui obtient seulement 38% de réponse clinique et 12% de réponse biologique (96). Ces observations sont corroborées par Mirza *et al.* qui démontrent, par une étude in vitro, qu'une souche résistante au métronidazole répond au traitement par nitazoxanide (93).

## 7.4 la paromomycine HUMATIN<sup>®</sup>

L'utilisation de la **paromomycine** a aussi été décrite mais uniquement dans les formes intestinales aiguës ou chroniques associées à des lésions cutanées à type d'urticaire (1). **L'association de ce médicament avec le métronidazole** a été couronnée d'un succès chez un patient résistant au métronidazole seul et au BACTRIM<sup>®</sup> (56).

## 7.5 ULTRALEVURE<sup>®</sup>

L'efficacité d'un champignon *Saccharomyces boulardii* a été testée chez des enfants symptomatiques positifs à *Blastocystis* spp. (90). Cette thérapeutique correspond à l'**ULTRALEVURE<sup>®</sup>** en France et favorise la restauration de la flore

microbienne. 94,4% des patients obtiennent la résolution des symptômes et l'éradication du parasite.

## 7.6 Autres molécules

D'autres molécules sont citées comme la méfloquine ou bien le furazolidone (93). Ces dernières années, les avancées relatives à la connaissance de *Blastocystis* spp. ont montré le rôle important des cystéines protéases dans la physiopathologie du parasite. En effet, elles permettraient le clivage des IgA sécrétoires et induiraient la production de cytokines proinflammatoires (93). L'inhibition de ces enzymes serait un mode d'action intéressant pour l'éradication de ce parasite. A ce jour, certains **inhibiteurs de cystéines protéases** sont testés comme agent thérapeutique pour d'autres parasitoses comme le paludisme, les trypanosomoses et les schistosomoses. L'étude menée par Mirza *et al.* met en évidence la sensibilité d'un inhibiteur de cystéine protéase, l'iodoacétamide, sur quatre souches de *Blastocystis* spp. testées.

Le manque de modèles animaux, l'absence de standardisation et le peu d'études sur la sensibilité *in vitro* des antiparasitaires sont autant d'entraves à définir une réelle stratégie thérapeutique en vue d'éradiquer *Blastocystis* spp. (20) ; néanmoins le FLAGYL<sup>®</sup> reste le médicament de choix en attendant des études complémentaires.

## 8. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les objectifs de ce travail sont, tout d'abord la mise au point d'une technique de PCR et le séquençage pour le génotypage de *Blastocystis* spp. permettant ainsi d'identifier les différents sous-types circulants, puis l'étude prospective sur sept mois sur les patients porteurs de *Blastocystis* spp. au C.H.U. de Bordeaux par une approche épidémiologique, clinique et biologique.

# DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE

## 1. RECRUTEMENT DES PATIENTS

Une étude prospective a été réalisée de janvier à juillet 2011 sur une période de 7 mois au laboratoire de parasitologie-mycologie (C.H.U. de Bordeaux-hôpital Saint-André). Tous les patients présentant un examen parasitologique des selles (EPS) positif à *Blastocystis* spp. ont été inclus dans l'étude. L'extraction des données a été réalisée via la base de donnée Bayer request®.

Pour chaque patient, identifié par un acronyme (trois premières lettres du nom suivi des deux premières du prénom), deux questionnaires, répertoriés en annexe 3 et 3 bis, ont été complétés: l'un clinique et épidémiologique, l'autre biologique. Les données cliniques et biologiques ont été obtenues par la base de donnée numérique propre à l'hôpital, Dx CARE®, et, les données épidémiologiques, par appel téléphonique auprès des patients après accord des chefs de service concernés.

## 2. LA PREPARATION DES ECHANTILLONS DE SELLES

Après avoir posé le diagnostic, il est important de préparer correctement l'échantillon pour les prochaines étapes. En effet, les formes vacuolaires de *Blastocystis* spp. retrouvées le plus fréquemment dans les selles, sont fragiles.

C'est pourquoi de nombreuses publications (38, 43, 97) décrivent une étape de culture *in vitro* permettant ainsi d'augmenter la sensibilité de détection et de maintenir des isolats en culture (14).

Dans nos travaux, nous n'utilisons pas cette étape de culture car longue et inapplicable en routine mais privilégions le prétraitement direct des échantillons. Cette étape permet, d'une part, de garantir l'intégrité du parasite, et d'autre part de s'affranchir d'éventuelles substances, comme l'héparine, risquant de négativer les



résultats des étapes d'analyses moléculaires suivantes, appelées inhibiteurs de PCR (98). En effet, les selles sont des milieux complexes, riches en résidus pouvant interférer sur la technique. C'est pourquoi il est nécessaire de les éliminer. Nous avons testé plusieurs méthodes :

- Méthode au Chlorure de Césium selon le procédé de Santin et al. (41, 99)
- Méthode avec tampon phosphate (PBS) sur culot de centrifugation employée au laboratoire pour la détection des amibes par PCR
- Méthode avec tampon PBS sur surnageant employée au laboratoire de virologie du C.H.U. de Bordeaux

## 2.1 Méthode au chlorure de Césium (41, 99)

### 2.1.1 Principe

Cette méthode a été décrite pour la détection des cryptosporidies par PCR. Elle est basée sur les propriétés du chlorure de césium à séparer les particules selon un gradient de densité. C'est une centrifugation isopycnique c'est à dire une centrifugation à l'équilibre: lorsque les particules atteignent leur densité de flottaison, elles arrêtent de migrer à l'intérieur du gradient, quel que soit le temps de centrifugation. Cette méthode permettrait d'une part de purifier *Blastocystis* spp., et d'autre part de les concentrer.

### 2.1.2 Mode opératoire

Quinze grammes de selles sont transférés dans un tube Falcon® de 50 ml, on y ajoute 35 mL d'eau distillée puis on homogénéise. La suspension est filtrée à travers un tamis de 50 µm et récupérée dans un autre tube en polypropylène Falcon® de 50 mL. Elle est complétée à 50 mL par de l'eau distillée. Une première centrifugation est effectuée à une vitesse de 3200 rpm (rotations par minute) pendant 15 mn. Le surnageant est éliminé et le culot, remis en suspension par 25 ml d'eau distillée. Vingt-cinq mL de Chlorure de Césium (référence C3011 de chez Sigma-Aldrich) sont ajoutés au mélange. Après avoir bien mélangé, une deuxième centrifugation est effectuée à 1300 rpm pendant 20 min.

*Blastocystis* spp. se trouvant dans la phase supérieure de la solution, on prélève 4 mL du surnageant que l'on verse dans une tube falcon® de 15 mL et auquel on rajoute 11 mL d'eau distillée. Cette suspension est centrifugée à 3200 rpm pendant 15 min. Le surnageant est cette fois-ci éliminé et le culot remis en

suspension dans 15 mL d'eau distillée pour être de nouveau centrifugé 3200 rpm pendant 15 min. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est éliminé et le culot final remis en suspension dans 500 µL d'eau distillée aliquoté avec un volume de 250 µL dans 2 tubes Eppendorf conservés au congélateur à -20°C.

### 2.1.3 Avantages et inconvénients

Elle permet d'éliminer tous les résidus de selles pouvant gêner les prochaines étapes d'analyse moléculaire. Le produit ainsi obtenu est bien purifié. Par contre, cette technique nécessite un échantillon de départ important (15 g de selles) et manque de sensibilité car elle ne nous permet pas de détecter tous les échantillons positifs. De plus, elle est longue et fastidieuse donc inadaptée en routine.

## 2.2 Méthode avec tampon PBS sur culot de centrifugation

### 2.2.1 Principe

Cette technique est déjà mise en place au laboratoire de parasitologie pour la préparation des échantillons de selles pour la recherche d'*E. histolytica/dispar* par PCR. Elle consiste à recueillir *Blastocystis* spp. dans le culot de centrifugation une fois lavé.

### 2.2.2 Mode opératoire

Une noix de selles est mise en suspension dans 10 mL de tampon PBS (référence 75511 de chez Biomérieux). Celle-ci est filtrée à travers une passoire métallique puis à travers un tamis de 50 µm et centrifugée à 3000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans 4 mL de PBS. Celui-ci sera aliquoté à raison de 250 µL de suspension par Eppendorf et conservé au congélateur à -20°C.

### 2.2.3 Avantages et inconvénients

Cette technique, contrairement à la précédente, permet d'utiliser peu de selles. De plus, cette préparation n'est pas très longue et présente l'avantage d'être déjà mise en place en routine.

Par contre, le fait de travailler sur le culot de centrifugation ne nous affranchit pas d'éventuels inhibiteurs de PCR même si l'échantillon a été lavé.

## 2.3 Méthode avec tampon PBS sur surnageant

### 2.3.1 Principe

Cette technique est utilisée en virologie au CHU de bordeaux pour la détection de virus dans les selles tels que adénovirus, cytomégalovirus. Elle permet de récupérer les virus dans le surnageant obtenu après centrifugation.

### 2.3.2 Mode opératoire

Une noix de selles sans filtration au préalable est mise en suspension dans du tampon PBS. Cette technique est basée sur le même temps de centrifugation, c'est-à-dire 5 min, mais à une vitesse nettement inférieure de 500 rpm ce qui permet de récupérer les virus et hypothétiquement *Blastocystis* spp. dans le surnageant et non dans le culot. La suspension est aliquotée à raison de 250  $\mu$ L par Eppendorf et conservé au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.3 Avantages et inconvénients

Cette technique est rapide mais s'est révélée peu sensible car malgré une centrifugation lente, les parasites restent dans le culot. En effet, les résultats obtenus avec cette technique n'ont pas été satisfaisants, trop d'échantillons restant négatifs, ce qui nous a conduit à abandonner cette méthode de préparation.

Suite aux essais des trois techniques de préparation, il apparaît que la technique de préparation des selles la plus sensible et la plus rapide est la méthode avec le tampon PBS sur le culot de centrifugation.

## 3. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE

L'extraction est une technique permettant d'isoler l'ADN des cellules ou tissus. L'ADN ainsi extrait peut être utilisé pour des analyses de biologie moléculaire telles que la PCR, le séquençage, ou bien le clonage. Il existe différents protocoles d'extraction qui suivent approximativement le même principe:

- Lyse des cellules,
- Elimination des protéines,
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN...),
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

L'extraction de l'ADN peut être manuelle ou automatique.

### 3.1 Extraction manuelle

#### 3.1.1 Technique de référence

La technique manuelle de référence utilise l'extraction par le couple phénol-chloroforme ; tout d'abord, il y a une étape de lyse composée par le couple détergent-protéinase K qui dissocie les cellules et les tissus, et libèrent les acides nucléiques. Ensuite, le phénol qui est un excellent agent dénaturant des protéines, va permettre de séparer efficacement les protéines des acides nucléiques. Son addition à une phase aqueuse a pour effet de dénaturer les protéines en solution dans le milieu: après centrifugation, elles se situent à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique. Après transfert de la phase aqueuse dans un autre tube, les acides nucléiques sont traités par un mélange chloroforme-alcool isoamylique. Les acides nucléiques se trouvent, après centrifugation, dans la phase aqueuse (75).

#### 3.1.2 Kits commerciaux

La plupart des auteurs utilisent l'extraction manuelle par un kit spécifique des selles prêt à l'emploi : QIAamp DNA stool minikit® (Qiagen)(17, 38, 41, 100, 101).

## 3.2 Extraction automatique

Le C.H.U. de Bordeaux est doté d'un extracteur automatique **MagNA Pure compact® Roche**. Cet automate permet une extraction par fixation des acides nucléiques aux billes de silices, principe illustré dans la figure 19) ; nous avons donc décidé de l'utiliser pour extraire l'ADN de nos échantillons.

Le principe consiste, dans un premier temps, à lyser les cellules et à digérer les protéines par l'action du tampon de lyse puis de la protéinase K. Dans un second temps, l'ADN va se fixer à des billes magnétiques ce qui permet d'éliminer les débris cellulaires. Puis il y a élution de l'ADN à haute température. Nous avons choisi de déposer 200  $\mu$ L d'échantillon de selles préalablement préparés et de récupérer un éluat dans un volume final de 100 $\mu$ L.

L'intérêt de l'extracteur automatique est d'une part, le gain de temps car une extraction pour 8 échantillons dure seulement 30 minutes, et d'autre part une reproductibilité optimale car tout est automatisé.

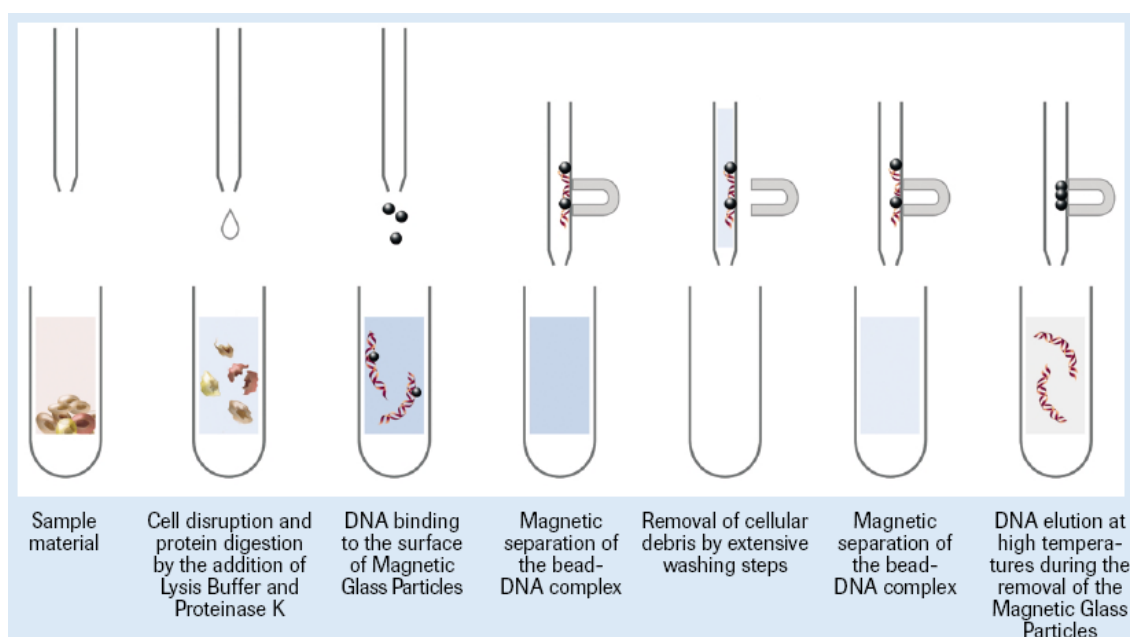


Figure 19: principe de l'extraction automatique par le MagNA Pure® Compact (102)

Nous contrôlons la présence et la quantité d'ADN génomique dans notre éluat en le dosant au spectrophotomètre UV-visible Nanodrop®. Cet appareil est très pratique car il nous renseigne quasi instantanément sur la quantité d'ADN

contenue dans notre échantillon. Le principe repose sur l'absorbance maximale de l'ADN à 260 nanomètres (nm) ce qui nous permet de le quantifier et, grâce au rapport de deux absorbances (260/280nm) d'évaluer la pureté de l'échantillon. Cette étape permet d'ajuster la quantité d'ADN nécessaire pour l'étape de PCR car il faut théoriquement entre 40 à 150 ng d'ADN dans le mix de PCR.

Les résultats de nos échantillons sont fluctuants autour de 150 ng/μL. A ce stade, les échantillons sont congelés à -20°C pour une conservation longue durée et peuvent être utilisés ultérieurement.

## 4. LA PCR

### 4.1 choix des amorces (17, 76, 103, 104)

Etant donné le nombre élevé de sous-types, 12 différents dont 9 identifiés chez l'Homme, les amorces doivent contenir non seulement une partie constante spécifique de l'espèce *Blastocystis* spp. mais aussi une partie propre à chaque sous-type (3). L'ARN ribosomique 18S, constitué de 1800 paires de base est utilisé dans de nombreuses publications (13, 41, 43). Le tableau 8, proposé par Van Gool en 2010 lors d'une conférence à l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease), montre le pourcentage de différences entre sous-types sur l'ARN ribosomique 18S : il met en évidence au moins 84 % de régions constantes et 16 % de régions variables.

|     | ST1   | ST2   | ST3   | ST4   | ST5   | ST6   | ST7   | ST8   |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ST1 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| ST2 | 6,3%  |       |       |       |       |       |       |       |
| ST3 | 14,2% | 15%   |       |       |       |       |       |       |
| ST4 | 12,3% | 11,7% | 11,5% |       |       |       |       |       |
| ST5 | 14%   | 14,2% | 12,1% | 12,3% |       |       |       |       |
| ST6 | 13,4% | 14,8% | 16,1% | 14,8% | 14,8% |       |       |       |
| ST7 | 15,4% | 15,7% | 14,8% | 14,0% | 14,0% | 14,4% |       |       |
| ST8 | 12,1% | 12,7% | 10,9% | 6,7%  | 12,5% | 15,7% | 13,4% |       |
| ST9 | 13,4% | 13,8% | 14,8% | 15,0% | 13,4% | 5,0%  | 14,4% | 15,2% |

Tableau 8: comparaison des différences génétiques entre sous-types sur 479 nucléotides de la petite sous-unité ribosomale 18S (3)

De nombreuses amorces ont été testées correspondant à des fragments d'ADN de longueurs différentes en paires de base pb (annexe 2) et nous avons retenu les amorces utilisées par Stensvold *et al.* dont l'amplifiat correspond à une longueur de 550 pb permettant de discriminer les différents sous-types de *Blastocystis* spp.(17). Leurs caractéristiques sont notées dans le tableau 9.

| Nom de l'amorce  | Séquence ( 5'→3')          | T° de fusion (Tm) en °C |
|------------------|----------------------------|-------------------------|
| Amorce F1        | GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC | 53,2                    |
| Amorce BHCR SEQ3 | TAA GAC TAC GAG GGT ATC TA | 53,2                    |

Tableau 9: caractéristiques des amorces utilisées

## 4.2 La préparation du mix

### 4.2.1 Choix de l'enzyme : ADN polymérase

L'ADN polymérase est un complexe enzymatique intervenant dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire. Celle retenue est utilisée en routine au CHU de Bordeaux sur le plateau de biologie moléculaire (PTBM), l'ampliTaq® Gold DNA polymérase de chez AppliedBiosystems. C'est une enzyme recombinante issue d'un micro-organisme *Thermus aquaticus* qui requiert toutes les qualités requises ; il est très sensible et se trouve à l'état inactif à température ambiante garantissant la stabilité du mix tout au long de sa préparation et à l'état actif après une étape de chauffage. De plus, la température de fusion (Tm) de nos amorces se situe autour de 53°C ce qui correspond tout à fait à l'intervalle de température d'hybridation de cette polymérase compris entre 37 et 65°C.

### 4.2.2 Les autres composés

Un mix de PCR est composé de différents éléments nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme, dont la plupart sont contenus dans le coffret de la polymérase :

- Les précurseurs trinuécléotidiques (dNTP) qui servent à former les brins d'ADN néoformés: dCTP, dGTP, dATP, dTTP
- Un tampon 10X nécessaire à l'enzyme, permettant comme son nom l'indique de tamponner le milieu

- Le Chlorure de Magnésium ( $MgCl_2$ ) qui par son cation  $Mg^{2+}$  est nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme et à l'incorporation correcte des précurseurs (75)

- Le Diméthylsulfoxyde 5% (DMSO) qui peut être nécessaire car il diminue les hybridations non spécifiques.

#### 4.2.3 Déroulement de la PCR

Nous utilisons une technique de PCR conventionnelle. Une fois tous les éléments réunis (éluat et mix de PCR), l'échantillon est placé dans un thermocycleur MWG BIOTECH® Primus HT puis traité selon le protocole suivant (tableau 10) :

| Etape               | Température (°C) | durée |
|---------------------|------------------|-------|
| Chauffage couvercle | 110°C            |       |
| Activation enzyme   | 95°C             | 7 min |
| <b>35 cycles</b>    |                  |       |
| Dénaturation        | 95°C             | 15s   |
| Hybridation         | 50°C             | 15s   |
| Elongation          | 72°C             | 1min  |
| Extension finale    | 72°C             | 7 min |

*Durées issues des recommandations du fabricant*

*Tableau 10: Protocole de PCR pour Blastocystis spp.*

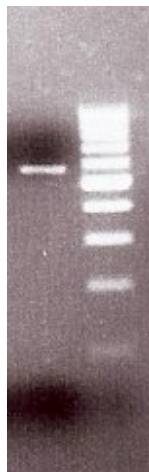
Pour établir la température d'hybridation des amorces, il est admis qu'il faut soustraire 5 degrés à la température de fusion (75). Nos amorces ayant une  $T_m$  de 53°C, la température d'hybridation théorique optimale serait de 48°C. Or, le fait de descendre au-dessous de 50°C augmente le risque d'hybridation non spécifique car plus la température est basse plus le risque est élevé. C'est pourquoi nous décidons de débiter la mise au point avec une température de 50°C.

#### 4.2.4 Vérification du résultat de la PCR

Les produits de PCR sont vérifiés par une électrophorèse sur gel d'agarose 2% composé d'agarose, de tampon TBE (tris-borate, EDTA) à 0,5X et de Bromure d'éthidium (BET) (75). Chaque éluat est déposé dans un des puits du gel ainsi qu'un marqueur de taille (PM), utilisé pour confirmer la bonne taille du fragment



cherché (100 pb DNA ladder® Invitrogen). A l'aide d'un champ électrique, l'ADN, chargé négativement, va migrer de la cathode vers l'anode. La fixation du BET, marqueur fluorescent à la lumière UV, à l'ADN va permettre d'augmenter sa fluorescence et ainsi de visualiser les produits de PCR sous forme d'une bande comme le montre la figure 20.



*Figure 20 : présence d'une bande correspondant à un fragment d'ADN (à gauche) avec le marqueur de taille (à droite) après migration sur gel d'agarose*

#### 4.2.5 Purification des produits de PCR en vue d'effectuer un génotypage

L'ADN obtenu doit être purifié afin d'éliminer tous les composés en excès dans le mix: amorces, dNTPs,  $MgCl_2$ , enzyme. Nous utilisons des colonnes (illustra™ MicroSpin™ S-300) qui permettent d'obtenir rapidement un ADN purifié. En effet, le principe de la technique repose sur une filtration sur gel à base de résine de Sephacryl™ qui retient tous les composés du mix excepté l'ADN qui est élué après centrifugation. En fonction de la taille en paires de base des fragments d'ADN obtenus, une colonne avec des tailles de pore adaptées est choisie.

## 5. LE SÉQUENÇAGE

### 5.1 Mode opératoire

L'application du séquençage dans notre étude va permettre d'identifier les différentes souches circulantes de *Blastocystis* spp. présentes dans les éluats d'ADN purifié.

Comme pour la PCR, nous préparons un mix pour le séquençage suivant le protocole du fabricant et détaillé dans le tableau 8. Par la technologie BigDye, le mix comprend des ddNTP fluorescents, des dNTP, l'ADN polymérase, l'amorce, le tampon 5X, l'ADN et l'eau stérile. Il est nécessaire pour chaque échantillon de préparer deux mix (tableau 11) contenant chacun l'une des deux amorces spécifiques du *Blastocystis* spp. (F1 ou BHCR SEQ3).

| composés                    | Quantité (µL) |
|-----------------------------|---------------|
| BigDye®terminator v3.1      | 1             |
| BigDye®sequencing buffer 5X | 3.5           |
| Amorce 3.2pmol/µL           | 1             |
| ADN                         | 1 à 3         |
| Eau stérile                 | QSP 20 µL     |

Tableau 11: composition du mix en vue du séquençage

Au préalable, une migration sur gel d'agarose permet une estimation de la quantité d'ADN à ajouter. En effet, la quantité d'ADN varie suivant l'intensité de la bande obtenue. Les échantillons ainsi préparés sont insérés dans le même thermocycleur que la PCR, pour le séquençage avec le programme suivant (tableau 12) :

| Étape            | Température (°C) | durée   |
|------------------|------------------|---------|
| Dénaturation     | 96°C             | 1 min   |
| <b>25 cycles</b> |                  |         |
| Dénaturation     | 96°C             | 10s     |
| Hybridation      | 50°C             | 5s      |
| Elongation       | 60°C             | 4min    |
| Extension finale | 4°C              | infinie |

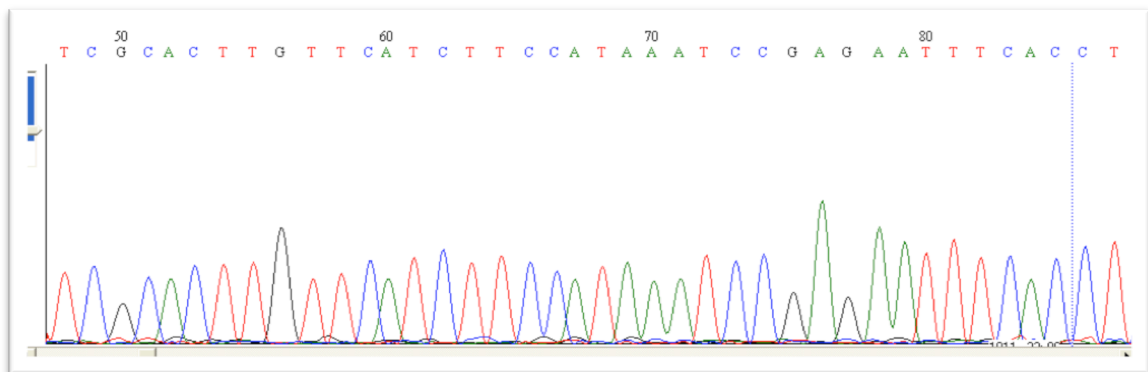
Tableau 12: Programme du séquençage

## 5.2 Purification des séquences

Le milieu contenant l'ADN doit être débarrassé de l'ADN polymérase, des amorces, des dNTP et ddNTP. Nous utilisons un mélange avec la solution BigDye® X terminator composée de billes et la solution Sample Additive Mixture (SAM) utilisée comme détergent. Grâce à une vive agitation de 30 min, suivie d'une centrifugation, les billes vont capturer les éléments en excès ainsi que les sels au fond du tube.

## 5.3 Détermination de la séquence d'ADN

Les fragments d'ADN sont analysés au laboratoire par le 3500 xL® Dx genetics analyzer de chez Applied Biosystems. Cet appareil est basé sur le principe de l'électrophorèse capillaire qui permet une séparation des différents fragments d'ADN, puis, par émission de fluorescence, il va traduire les données transmises par une caméra (Caméra Couple Device CCD). Cette analyse spectrale permet alors d'assigner la base correspondante et ainsi de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice (figure 21).



*Figure 21: exemple de chromatogramme obtenu après analyse des séquences par le séquenceur*

## 5.4 Analyse des séquences et arbre phylogénique

Les chromatogrammes ainsi obtenus sont analysés par le logiciel BioEdit v7.0.1. Les séquences sont ensuite alignées via l'application ClustalW et

comparées avec toutes les séquences de *Blastocystis* spp. répertoriées dans la base de données, National Center for Biotechnology Information (NCBI), par l'interface BLAST(105). Ainsi, les sous-types ont été identifiés avec une complète ou très proche similitude moléculaire avec les séquences des sous-types répertoriés allant de 98 à 100%.

L'analyse phylogénique a été effectuée par le logiciel MEGA v5.0. Elle permet de réaliser un arbre phylogénique afin d'organiser les souches selon les homologies de séquences d'ADN obtenues. Comme dans la plupart des études, cet arbre a été enraciné par la méthode du groupe externe (outgroup) avec le flagellé *Proteromonas lacertae* (106, 107), qui est l'ancêtre commun le plus proche du groupe de *Blastocystis* spp.

L'arbre phylogénique est construit à partir de la méthode Neighbour Joining (108). La distance génétique a été calculée par l'intermédiaire du test statistique Kimura 2-paramètre. Pour s'assurer de la stabilité de l'arbre phylogénique, la méthode de ré-échantillonnage « bootstrap » a été appliquée mille fois.

# TROISIEME PARTIE : OPTIMISATION DE LA METHODE EMPLOYEE ET PERSPECTIVES D'EVOLUTION

## 1. OPTIMISATION DE LA PCR

### 1.1 Première étape: détermination de la concentration optimale en MgCl<sub>2</sub>

Pour mettre au point une technique de PCR, il est utile de faire une gamme de concentration croissante en MgCl<sub>2</sub> avec ou sans DMSO 5% pour trouver la composition optimale du mix. Les concentrations en MgCl<sub>2</sub> varient de 0,75 mM à 1,5 mM. Nous avons ajouté un témoin négatif (1) pour s'assurer de l'absence de réaction non spécifique et avons testé deux quantités d'ADN différentes (1 et 2 µL) pour être certain de la quantité d'ADN nécessaire à l'amplification (tableau 13).

|                         | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | Unité<br>µL |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|
| Buffer 10X              | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    |             |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM | 2    | 2    | 3    | 2    | 2    | 3    | 1,5  | 2,5  | 1,5  | 2,5  |             |
| DMSO 5%                 | 2,5  | 0    | 0    | 2,5  | 0    | 0    | 0    | 0    | 2,5  | 2,5  |             |
| dNTP10 mM               | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |             |
| Amorce F1<br>(20 µM)    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |             |
| Amorce BHCR<br>(20 µM)  | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |             |
| ADN                     | 0    | 2    | 2    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |             |
| Enzyme<br>5 U/µL        | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |             |
| Eau QSP 50 µL           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |             |

Tableau 13: Gamme de concentration en MgCl<sub>2</sub> testée et DMSO

La figure 22 montre les résultats de la PCR ; nous observons que la concentration optimale en MgCl<sub>2</sub> est de 1,5 mM soit une quantité de 3 µL dans le mix avec l'échantillon numéro six.

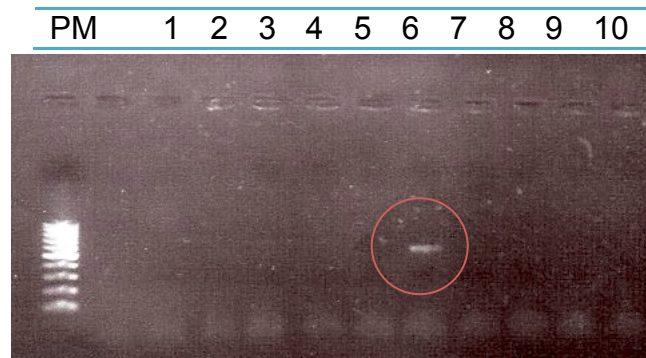


Figure 22: Gamme de concentrations en  $MgCl_2$  (bande pour l'échantillon 6)

Les concentrations retenues pour la préparation du mix sont énoncées ci-dessous dans le tableau 14 :

| Mix              | concentration | 1 échantillon ( $\mu L$ ) |
|------------------|---------------|---------------------------|
| Buffer           | 10X           | 5                         |
| $MgCl_2$         | 1,5 mM        | 3                         |
| DNTP             | 0,2 mM        | 1                         |
| Amorce F1        | 0,4 $\mu M$   | 1                         |
| Amorce BHCR SEQ3 | 0,4 $\mu M$   | 1                         |
| Enzyme           | 1,25 U        | 0,25                      |
| ADN              |               | 2                         |
| Eau stérile      |               | QSP 50 $\mu L$            |

Tableau 14: Concentrations retenues pour la préparation du mix

## 1.2 Deuxième étape: temps de dénaturation et d'hybridation

Pour obtenir un signal plus important, nous avons décidé d'augmenter les temps de dénaturation et d'hybridation à 30 secondes au lieu de 15. De plus, le fait d'augmenter le nombre de cycle ne nous a pas permis d'avoir un meilleur signal.

Nous avons associé cet allongement de durée à une concentration en enzyme normale et doublée (de 0,25  $\mu L$ , nous passons à 0,50  $\mu L$ ). Pour illustrer ce changement, un échantillon a été testé pur et dilué au 1/2 (figure 23).

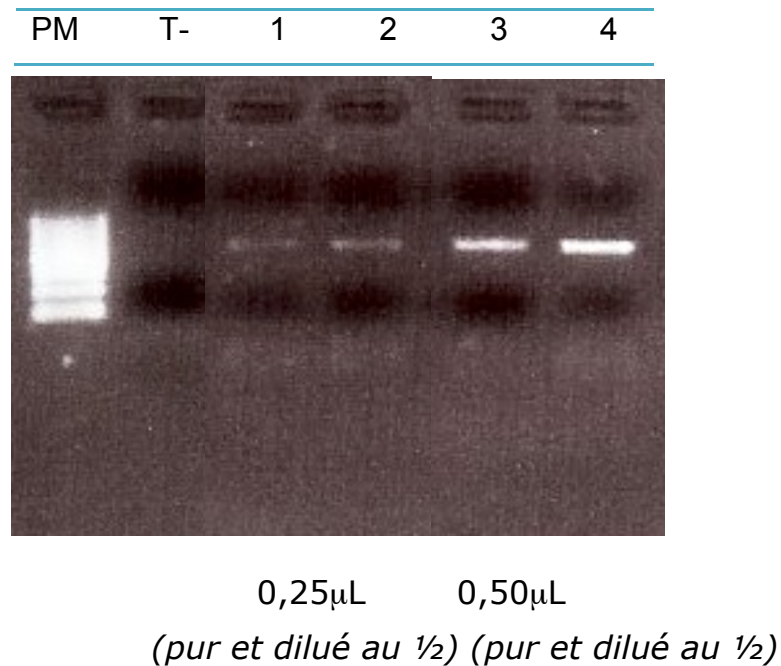


Figure 23 : PCR avec temps de dénaturation et d'hybridation de 30 s et concentration en enzyme de 0,25  $\mu$ L (1 et 2) et de 0,50  $\mu$ L (3 et 4) sur un échantillon testé pur et dilué au 1/2

Nous en concluons qu'il existe une nette amélioration du signal non seulement avec une concentration d'enzyme plus élevée mais aussi par la dilution de l'échantillon ce qui va avoir son importance par la suite dans la diminution des inhibiteurs de PCR.

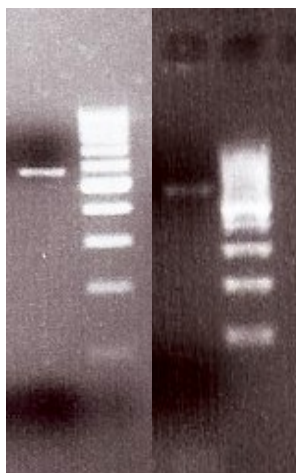
### 1.3 Deuxième étape : température d'hybridation

Pour affiner la température d'hybridation, nous avons réalisé une PCR avec un gradient de températures allant de 47,9 C   53,4 C récapitulé dans le tableau 15.

| Gradient | Température testée (T C) |
|----------|--------------------------|
| 1        | 47,9                     |
| 2        | 49,2                     |
| 3        | 50,5                     |
| 4        | 51,9                     |
| 5        | 53,4                     |

Tableau 15: gradient de température d'hybridation utilisé

La température obtenant un meilleur signal est de 47,9°C (gradient 1). Un exemple est donné par la figure 24 qui compare l'intensité de la bande obtenue entre le gradient 1 et 3. La température du gradient 1 correspond à la température théorique de 48°C qu'il aurait fallu appliquer directement pour ces amorces. Cependant, comme le risque lié à une température d'hybridation basse est d'avoir l'apparition de bandes non spécifiques et qu'ici aucune autre bande n'est détectée, il est donc possible d'utiliser cette température.



*Figure 24: exemple de comparaison entre les résultats obtenus par le gradient 1 (à gauche) et le gradient 3 (à droite)*

## 1.4 Troisième étape : échantillons à faible signal

La durée de dénaturation et d'hybridation a été allongée à 45 secondes pour les échantillons à faible signal associée à une concentration en enzyme de 0,75 $\mu$ L. Nous obtenons une légère amélioration de l'intensité de la bande qui a pour effet d'obtenir, pour certains échantillons, la quantité d'ADN nécessaire en vue du séquençage.

## 1.5 Quatrième étape: diminution des inhibiteurs de PCR

Plusieurs techniques sont utilisées pour s'affranchir de ces inhibiteurs : la dilution, le lavage, le chauffage (109).



### 1.5.1 Mise en place d'une gamme de dilutions pour tester l'ADN à des concentrations différentes

Après avoir observé l'impact de la dilution sur l'intensité du signal (figure 23 page 75), une gamme de quatre concentrations différentes a été établie et testée pour chaque patient (tableau 16) :

|                      |                |
|----------------------|----------------|
| Concentration 1 (C1) | Pur            |
| Concentration 2 (C2) | dilué au 1/2   |
| Concentration 3 (C3) | dilué au 1/10  |
| Concentration 4 (C4) | dilué au 1/100 |

Tableau 16: gamme de dilutions établie pour chaque échantillon

Les résultats de la figure 25 confirment l'hypothèse précédente selon laquelle une dilution importante (1/10 ou 1/100) permet de s'affranchir des inhibiteurs de PCR. La mise en place de cette gamme a permis d'augmenter nettement la sensibilité mais il reste encore certains échantillons dont l'amplification ne marche pas.

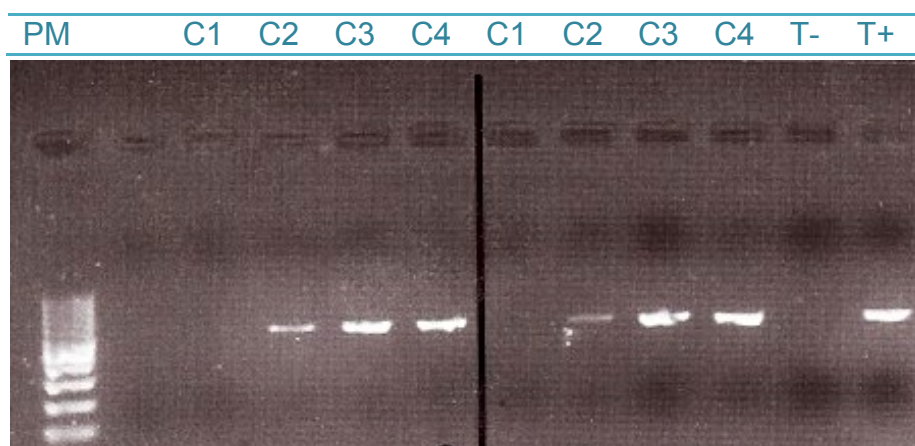


Figure 25: Résultats de la gamme de dilutions sur 2 patients

### 1.5.2 Chauffage de l'échantillon avant extraction

Le fait de chauffer l'échantillon avant extraction permet de réduire les inhibiteurs ; cette technique est utilisée par Jones *et al.* et consiste à chauffer à haute température l'échantillon préparé (110). Nous avons donc décidé de

transposer ce protocole à nos échantillons avec un chauffage de 10 min à 95°C pour augmenter la sensibilité et pouvoir ainsi obtenir un signal correct au vue du séquençage. Les premiers résultats obtenus sont encourageants car des prélèvements négatifs avec notre technique initiale ont été amplifiés après chauffage (figure 26).

Nous avons donc décidé de rajouter cette étape de chauffage avant extraction pour tous les échantillons de selles préparés.

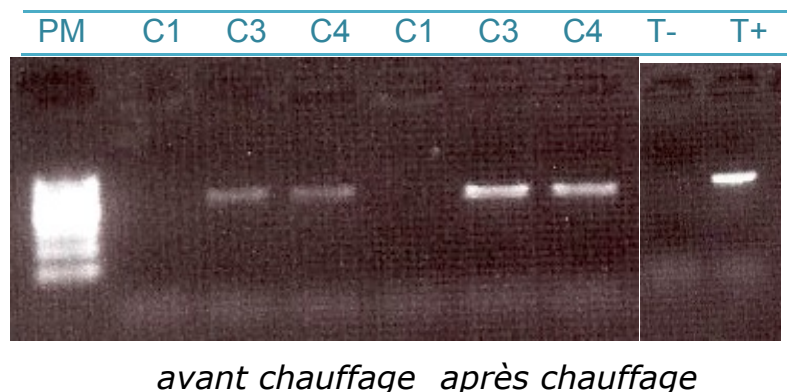


Figure 26 : résultat d'un échantillon avant et après chauffage

## 2. SENSIBILITE DE NOTRE TECHNIQUE COMPAREE AUX AUTRES METHODES

Avec notre technique, nous avons réussi à amplifier 32 échantillons sur 36 ce qui correspond à une sensibilité de 89%.

### 2.1 Préparation de l'échantillon avant extraction

Souppart *et al.* ont testé l'extraction de l'échantillon sans préparation au préalable et ils obtiennent une sensibilité de 68% nettement inférieure à celle obtenue dans notre étude prouvant que l'étape de préparation est essentielle pour diminuer les inhibiteurs de PCR et permettre l'amplification du fragment d'ADN voulu (37).

### 2.2 Culture avant extraction

La culture est fréquemment utilisée pour amplifier le nombre de parasites et s'affranchir des inhibiteurs de PCR. Elle permet d'obtenir une sensibilité de 100%

d'après une étude menée par Souppart *et al.* (37). Par contre, la culture est une méthode longue qui nécessite au moins 24 heures de croissance (7); de plus, certains sous-types poussent difficilement (ST7), responsables de faux négatifs (1).

## 2.3 Extraction automatique et extraction manuelle

La plupart des études utilise des kits d'extraction manuelle tels que le QIAamp DNA stool minikit® (Qiagen), le magNA Pure LC DNA Isolation Kit I® (Roche) ou bien encore le ZR Fecal DNA Kit® (Zymo research). Une étude menée par Yoshikawa *et al.* en 2011 a évalué la performance de ces kits commerciaux et conclut qu'il existe des différences importantes de sensibilité: 10% pour Roche, 48% pour Qiagen et 94% pour Zymo research (111).

Dans notre étude, nous avons testé une méthode innovante par l'automatisation de cette étape d'extraction. En effet, le CHU de Bordeaux possédant un extracteur automatique, le MagNA Pure Compact instrument®, nous l'avons utilisé pour extraire nos échantillons préparés. C'est une étape pratique et rapide comparée à l'extraction manuelle. De plus, la sensibilité de notre technique de 89% est nettement supérieure au kit le plus largement utilisé, le QIAamp DNA stool minikit® (Qiagen), avec 48%.

## 2.4 PCR conventionnelle et coinfections

Certaines amorces appelées séquences ciblées (STS) permettent par la PCR conventionnelle de détecter directement les coinfections grâce au profil électrophorétique correspondant à plusieurs sous-types (60).

Pour déterminer les coinfections avec le couple d'amorces choisi, certains auteurs utilisent une étape de clonage c'est-à-dire que le produit de PCR est inséré dans un plasmide et amplifié par une bactérie ultra compétente. Les différents clones sont ensuite séquencés (environ 10 par patients) puis comparés à la même banque de donnée. Il est alors possible de voir si les clones sont différents ou identiques (37, 41, 43).

Dans notre étude, deux échantillons ont montré un profil faisant suspecter une coinfection. Le chromatogramme était composé de zones lisibles correspondant aux régions constantes et de zones avec deux courbes

superposées différentes. Pour tenter d'identifier la présence de deux sous-types différents, nous avons effectué une PCR en temps réel par la technique SYBR<sup>®</sup>green afin d'obtenir peut être deux T<sub>m</sub> différents, chacun spécifique d'un sous-type.

Malheureusement, pour ces échantillons-là, aucune interprétation n'a pu être faite. Il aurait fallu réitérer l'expérience car peut être que les échantillons n'étaient pas à des concentrations optimales.

### 3. PERSPECTIVES D'AVENIR

Deux études récentes ont mis en place la PCR en temps réel. Cette technique permet en une seule étape d'amplifier et de différencier les sous-types en fonction de leurs T<sub>m</sub> permettant ainsi de réduire la durée des manipulations de moitié (38, 110). Cependant, pour mettre au point cette méthode, il est nécessaire d'avoir des souches de différents sous-types connus pour établir les différentes courbes de fusion.

Cette technique n'était pas envisageable au début par manque de souches de référence. Or, il serait intéressant, à l'avenir de développer cette nouvelle technique au laboratoire puisqu'avec les échantillons obtenus, nous pourrions établir ces courbes de fusion spécifiques de chaque sous-type et proposer aux cliniciens le typage du *Blastocystis* spp. en routine.

# QUATRIEME PARTIE : ETUDE PROSPECTIVE AU C.H.U DE BORDEAUX ; RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. PREVALENCE DES PARASITES RETROUVES A L'EPS

Sur une période de sept mois (du 14 janvier au 25 juillet 2011), 1783 selles ont été analysées au laboratoire de parasitologie, ce qui correspond à environ 900 patients. L'EPS s'est révélé positif chez 85 patients correspondant à 131 analyses.

*Blastocystis* spp. est le parasite le plus largement retrouvé car il est présent chez 47 patients sur les 85 ayant un EPS positif soit chez 55,3% suivi des protozoaires non pathogènes (*E. coli* et *E. nanus*) puis de *Giardia duodenalis*. Le tableau 17 illustre la prévalence des parasites intestinaux retrouvés. Le total des patients infectés s'élève à 117 car certains patients sont porteurs des coinfections et le tableau présenté ci-dessous ne tient pas en compte des coinfections.

| Parasites                           | Nombres de patients | Pourcentage (%) |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------|
| <i>Blastocystis spp.</i>            | 47                  | 40,2            |
| <b>Protozoaires non pathogènes</b>  | 42                  | 35,9            |
| <i>Entamoeba coli</i>               | 16                  | 13,7            |
| <i>Endolimax nanus</i>              | 14                  | 12              |
| <i>Sarcocystis hominis</i>          | 5                   | 4,3             |
| <i>Entamoeba hartmanni</i>          | 2                   | 1,7             |
| <i>Trichomonas intestinalis</i>     | 2                   | 1,7             |
| <i>Chilomastix mesnili</i>          | 1                   | 0,8             |
| <i>Iodamoeba bütschlii</i>          | 1                   | 0,8             |
| <i>Enteromonas hominis</i>          | 1                   | 0,8             |
| <b>Protozoaires pathogènes</b>      | 11                  | 9,4             |
| <i>Giardia duodenalis</i>           | 8                   | 6,8             |
| <i>Dientamoeba fragilis</i>         | 1                   | 0,9             |
| <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> | 1                   | 0,9             |
| <i>Cyclospora cayetanensis</i>      | 1                   | 0,9             |
| <b>Helminthes</b>                   | 17                  | 14,5            |
| <i>Strongyloides stercoralis</i>    | 5                   | 4,3             |
| <i>Taenia saginata</i>              | 3                   | 2,6             |
| <i>Schistosoma mansoni</i>          | 3                   | 2,6             |
| <i>Ancylostoma duodenale</i>        | 2                   | 1,7             |
| <i>Trichuris trichura</i>           | 2                   | 1,7             |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i>     | 1                   | 0,9             |
| <i>Enterobius vermicularis</i>      | 1                   | 0,9             |
| <b>TOTAL</b>                        | 117                 | 100             |

Tableau 17: Prévalence des parasites intestinaux chez les patients ayant un EPS positif

Ces résultats sont corrélés à ceux issus de la littérature puisqu'il est admis que *Blastocystis spp.* est souvent cité comme étant le parasite le plus fréquemment rencontré dans les échantillons de selles dans des proportions variant de 32% à 51,5%. Il est suivi par les protozoaires non pathogènes tels que *E. coli* ou bien *E. nanus* (1, 34, 112).

## 2. COINFECTIONS DU *BLASTOCYSTIS* SPP. AVEC D'AUTRES PARASITES INTESTINAUX.

*Blastocystis* spp. est associé dans 34% des cas à un autre parasite intestinal soit 16 patients sur 47. Le plus fréquent, *E. nanus* est retrouvé dans 50% des coinfections, suivi d'*E. coli* (tableau 18). Une étude épidémiologique menée en France par Souppart *et al.* en 2009 (37) met en évidence 30 % de coinfections avec les parasites cités précédemment. Ceci confirme les observations de Graczyk *et al.* et de Lu *et al.* qui suggèrent que la coinfection avec des parasites intestinaux de transmission féco-orale est un facteur de risque d'infection à *Blastocystis* spp. (113, 114).

| Patients anonymisés         | B<br>A<br>T<br>G<br>U | C<br>E<br>T<br>M<br>U | C<br>H<br>A<br>G<br>U | C<br>R<br>E<br>B<br>E | D<br>A<br>L<br>C<br>H | D<br>A<br>R<br>A<br>L | D<br>R<br>A<br>R<br>E | G<br>A<br>D<br>N<br>I | J<br>A<br>S<br>J<br>E | M<br>A<br>G<br>J<br>O | M<br>I<br>N<br>M<br>B | R<br>A<br>S<br>F<br>L | R<br>E<br>U<br>J<br>O | S<br>A<br>B<br>J<br>E | V<br>I<br>N<br>J<br>E | V<br>O<br>G<br>V<br>E |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Protozoaires non pathogènes |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>E. coli</i>              |                       | +                     |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>E. nanus</i>             |                       |                       | +                     |                       |                       | +                     |                       | +                     |                       | +                     | +                     |                       | +                     | +                     |                       | +                     |
| <i>E. hartmanni</i>         |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |
| <i>E. hominis</i>           |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>I. bütschlii</i>         |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| Protozoaires pathogènes     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>G. duodenalis</i>        |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |
| <i>D. fragilis</i>          |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |
| <i>D. dendriticum</i>       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>C. cayetanensis</i>      |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |
| Helminthes                  |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>S. mansoni</i>           | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>A. duodenale</i>         |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>E. vermicularis</i>      |                       |                       |                       |                       |                       |                       | +                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |

Tableau 18: coinfections du *Blastocystis* spp. avec les autres pathogènes

### 3. ANALYSE EPIDEMIOLOGIQUE

#### 3.1 Prévalence du *Blastocystis* spp.

Ce parasite a été isolé chez 47 patients sur un total de 900 patients ayant eu un EPS pendant la durée de l'étude. La prévalence au CHU de bordeaux est donc évaluée à 5,2% ce qui est en accord avec les autres pays européens notamment avec l'étude française menée par Bourée *et al.* en 2007 (5) qui rapporte 6,1% et une étude italienne 13,6% (34). La prévalence obtenue est nettement inférieure à celle obtenue dans les PED (prévalence de l'Egypte à 33,3%) (37).

#### 3.2 Répartition en fonction des services hospitaliers

La répartition par service est décrite dans le tableau 19 avec une population majoritaire provenant du service de médecine interne et maladie tropicale à l'hôpital Saint-André (24 patients sur 47). Cela s'explique par la forte proportion de gens qui voyagent.

| Chef de service            | Unité géographique (UG) | Service                          | Nombre de patients | Nombre de patients |
|----------------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Pr DE LEDINGHEN</b>     | 1650                    | HL GASTRO-ENTEROLOGIE C3         | 2                  | 2                  |
| <b>Pr LONGY-BOURSIER</b>   | 1040                    | SA M.INT/MAL.TROPICALE U21       | 2                  | 24                 |
|                            | 1093 3728               | SA C.EXT M.INT/MAL.TROPICALES    | 16                 |                    |
|                            | 1086                    | SA M.INT/MAL.TROPICALE U28       | 3                  |                    |
|                            | 1013                    | SA HOP.SEMAINES U.20             | 3                  |                    |
| <b>Dr OLLIVIER</b>         | 7305 7344               | MEDECINE DU TRAVAIL              | 5                  | 5                  |
| <b>Pr ZERBIB</b>           | 1627                    | SA HEPATO-GASTROENTEROLOGIE      | 1                  | 1                  |
| <b>Pr MORLAT</b>           | 1076                    | SA M. INT/M. INF U 26            | 1                  | 1                  |
|                            | 1098                    | SA M. INT/M. INF U 22            | 1                  | 1                  |
| <b>PR DUPON</b>            | 1722                    | PEL MEDECINE 4A1                 | 1                  | 1                  |
| <b>PR RAGNAUD</b>          | 1712                    | PEL MEDECINE 4A3                 | 2                  | 2                  |
| <b>Pr MERVILLE</b>         | 1936                    | PEL NEPHROLOGIE /TRANSPLANTATION | 1                  | 1                  |
| <b>Pr COMBE, Dr DELMAS</b> | 1937 2081               | PEL NEPHROLOGIE                  | 3                  | 3                  |
| <b>Pr MILPIED</b>          | 1625                    | HL HEMATOLOGIE G5                | 1                  | 1                  |
| <b>Dr PILLET</b>           | 9760 7581               | PEL URGENCES PEDIATRIQUES        | 3                  |                    |
| <b>PR VERGNES</b>          | 2142                    | PEL CHIRURGIE PEDIATRIQUE 3èmeB  | 1                  | 5                  |
| <b>Dr PEDESPAN</b>         | 1116                    | PEL DEPARTEMENT DE PEDIATRIE 6EC | 1                  |                    |
| <b>TOTAL</b>               |                         |                                  | <b>47</b>          | <b>47</b>          |

Tableau 19: répartition des patients en fonction des services cliniques



On en retrouve également dans le service de néphrologie, qui prescrit en systématique un EPS dans le cadre du bilan pré-greffe et en fonction de l'origine des patients ou dès qu'il y a un contexte de voyage. Mais également, le service de médecine du travail qui demande un EPS et une coproculture en systématique chez tous les agents recrutés pour travailler dans les cuisines du CHU ; 5 patients issus de ce service sont porteurs du *Blastocystis* spp.

On peut donc en conclure qu'une forte proportion de patients hébergeant *Blastocystis* spp. sont a priori asymptomatiques.

### 3.3 *Blastocystis* spp. et immunodépression

Les patients immunodéprimés seraient une population à risque (34). Dans notre étude, 6 patients sur 47 soit 12,8%, énumérés dans le tableau 20, présentent une immunodépression liée à une maladie auto-immune (MAI) ou à une hémopathie. Chez ces patients, la présence de *Blastocystis* spp. est associée à des troubles digestifs dans 80% des cas soit 4 patients sur 5 et à un syndrome inflammatoire, probablement dû aux pathologies sous-jacentes. Ces résultats confirment que l'immunodépression est un facteur de risque de l'infection à *Blastocystis* spp. et qu'il conviendrait de traiter en systématique les patients immunodéprimés symptomatiques quand l'EPS est positif.

| Patients | Âge | sexe | ST | Immuno-dépression | Signes digestifs | Pathologies associées                            |
|----------|-----|------|----|-------------------|------------------|--|
| BARAR    | 37  | M    | NR | oui               | oui              | MAI<br>maladie de Berger<br>(transplanté rénale) |
| BAULU    | 3   | M    | 2  | oui               | oui              | Hépatoblastome                                   |
| CHAGU    | 64  | M    | NR | oui               | NR               | Hémopathie                                       |
| HASYV    | 57  | M    | 4  | oui               | oui              | DICV   |
| LUCGU    | 70  | M    | 3  | oui               | oui              | MAI (sclérodémie<br>systémique)                  |
| PIRPA    | 49  | M    | 4  | oui               | non              | MAI<br>(maladie de Wegener)                      |

NR non renseigné

Tableau 20: *Blastocystis* spp. et immunodépression

### 3.4 Répartition homme / femme

*Blastocystis* spp. est un parasite retrouvé aussi bien chez l'homme que chez la femme puisque la répartition se compose de 24 hommes (H) et 23 femmes (F) soit un sexe ratio H/F de 1,04. Ces résultats corroborent les travaux de nombreuses études (34, 36, 44).

### 3.5 Répartition en fonction de l'âge

La moyenne d'âge est de 40 ans. Sur les 47 patients, on rapporte 5 cas pédiatriques soit 11% de la population étudiée et 13 patients dont l'âge est supérieur à 60 ans. D'après le tableau 21, la majorité des patients est dans la tranche d'âges 15-60 ans comprenant 62% de la population parasitée (29 patients). Le nombre de femmes est plus élevé dans la tranche d'âge 15-60 ans (18 femmes contre 11 hommes) tandis que les hommes sont plus représentés dans la tranche d'âge > 60 ans (3 femmes contre 10 hommes).

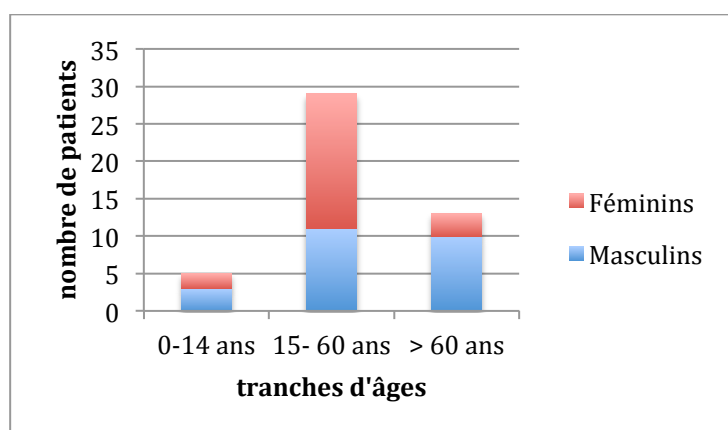


Tableau 21: Répartition de la population étudiée selon l'âge et le sexe

Dans la littérature, il a été rapporté une forte prévalence de 36,4% chez les enfants de moins de cinq ans en Colombie, que l'on ne retrouve pas ici (51). On peut donc en conclure que *Blastocystis* spp. représente une incidence faible chez les enfants dans les pays développés mais que l'incidence est beaucoup plus élevée dans les PED.

## 3.6 Habitation rurale / urbaine et contact avec les animaux

D'après les informations recueillies, La répartition est homogène avec 48% des patients vivant en zone urbaine (23 patients) et 52% (22 patients) des patients vivant en zone rurale. Or, d'après l'étude de Li *et al.*, la prévalence en Chine de *Blastocystis* spp. serait plus élevée en milieu rural (36). Ils expliquent ce résultat par les conditions d'hygiène précaires dans les régions rurales de Chine ce qui ne correspond pas aux habitations rurales françaises.

De plus, Stensvold *et al.* établissent comme facteurs de risque le contact avec les animaux (20). Notre recueil de données étant trop faible, il n'est pas possible de conclure sur l'éventuel lien entre la présence de *Blastocystis* spp. et le contact avec des animaux. De plus, que ce soit à la ville ou à la campagne, la majorité des patients interrogés, répertoriés dans le tableau 22, ne possédait pas d'animaux.

| Animaux               | Zone urbaine<br>nombre de patients (%) | Zone rurale<br>nombre de patients (%) |
|-----------------------|--|---------------------------------------|
| aucun animal          | 9 (56,2)                               | 13(76,5)                              |
| chien                 | 2(12,5)                                | 1(5,9)                                |
| chat                  | 2(12,5)                                | 0                                     |
| chat/chien            | 1(6,3)                                 | 1(5,9)                                |
| chat/chien/lapin      | 1(6,3)                                 | 0                                     |
| chat/cheval           | 1(6,3)                                 | 0                                     |
| Chat/chèvre/oie/vache | 0                                      | 1(5,9)                                |
| Espèce non précisée   | 0                                      | 1(5,9)                                |
| NR                    | 7                                      | 5                                     |

NR : non renseigné

Tableau 22: relation entre la présence d'animaux et la localisation urbaine ou rurale des patients

## 3.7 Répartition selon les sous-types

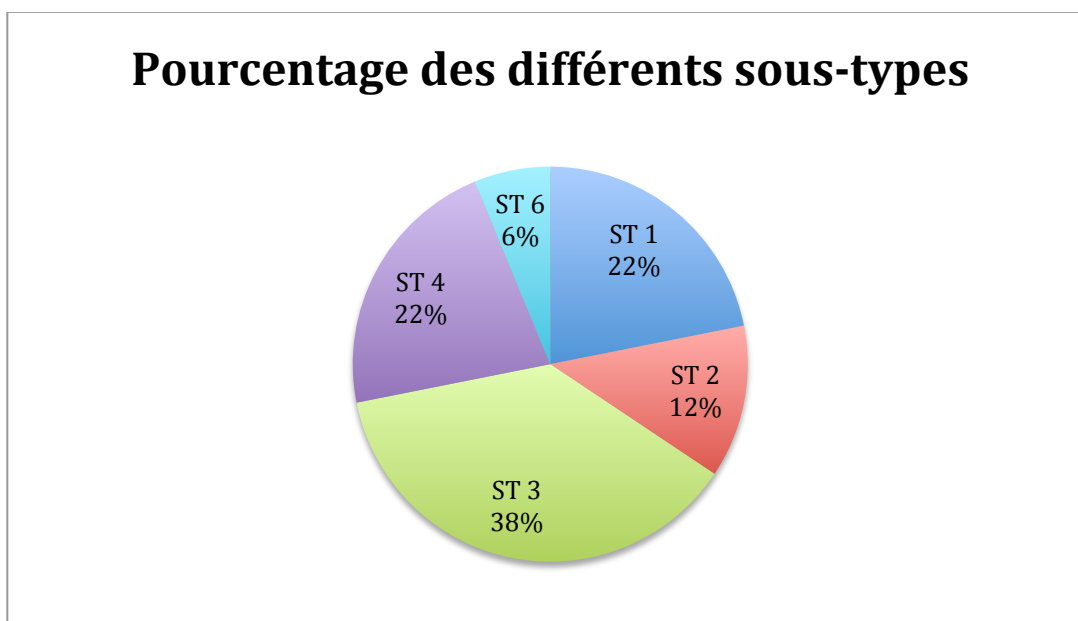
### 3.7.1 Comparaison des résultats aux données de la littérature

L'identification des différents sous-types a été testée sur 36 patients au lieu de 47. Certains patients positifs à *Blastocystis* spp. n'ont pas pu être inclus en raison de la difficulté d'une mise au point de la technique de PCR concomitante au recrutement : quelques échantillons de selles en quantité insuffisante et de rares

oublis de préparation d'échantillons expliquent le fait que 9 patients ne figurent pas dans ce recrutement.

Sur les 36 échantillons testés par PCR, 32 ont pu être amplifiés et séquencés avec succès. Les 4 revenus négatifs s'expliquent certainement par la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon malgré toutes les précautions prises pour les éliminer. Dans deux échantillons, comme nous l'avons dit précédemment, une coinfection avec deux sous-types a été évoquée sans pouvoir l'affirmer. Toutefois après comparaison de la séquence majoritaire à la banque de données GenBank via BLAST (105), nous avons pu établir au moins un sous-type par échantillon avec une faiblesse de similitude de 94% au lieu de 98-100% requis. Les sous-types pour les deux patients CETMU et PONJO seraient en faveur de ST3 pour le premier et ST1 pour le second.

Dans notre étude, ST3 est le plus couramment identifié (38%) suivi de ST1 et ST4 dans les mêmes proportions (22% chacun), puis ST2 (12%) et ST6 (6%) (figure 27).



*Figure 27: Répartition de la population étudiée selon les sous-types de Blastocystis spp.*

Il existe à l'heure actuelle 12 sous-types décrits dans la littérature dont 9 présents chez l'homme (1, 61). La plupart des études rapportent que ST3 est le sous-type le plus fréquemment isolé. ST1 est le deuxième sous-type identifié en

Allemagne, Grèce, Egypte, Chine, Bangladesh, Pakistan et Singapour et ST4 le second au Danemark et en Allemagne. ST2 est fréquemment rencontré en Turquie et au Danemark puis ST6 et 7 au Japon, Egypte et Pakistan, rarement en Europe (figure 11 page 32) (37).

La répartition française a été décrite dans deux études récentes obtenant des résultats différents. L'histogramme de la figure 28 à la page suivante compare ces deux études avec la nôtre. Dans celle de Souppart *et al.* à Lille(37), ST3 est retrouvé en majorité (53,5%) suivi de ST1 (25,6%) puis ST2 et ST4 (9,3% chacun) ce qui correspond à la répartition globale des autres pays. L'autre étude menée par Poirier *et al.* à Clermont Ferrand (38), décrit ST4 comme sous-type le plus fréquent (63%) puis ST3 (14,8%), ST7 (11,1%) et enfin ST1, ST2 et ST6 (3,7% chacun).

Ainsi, notre répartition trouvée est plus proche de celle de Souppart *et al.* puisque les deux premiers sous-types majoritairement retrouvés sont ST3 puis ST1. De plus, on obtient le même pourcentage de ST2 (12%). La proportion de ST4 dans notre étude est de 22%, plus basse chez Souppart *et al.* (9,3%) et presque trois fois plus élevée chez Poirier *et al.*, qui définissent ST4 comme étant le sous-type majoritairement rencontré à Clermont Ferrand. Poirier *et al.* étudient une population issue à 50% d'un service d'hématologie tandis que notre population provient de services différents et présente des notions de voyages récents.

Par contre, la surprise est l'identification de ST6 chez deux patients soit 6% des cas, sous-type isolé en Asie et Afrique et rarement en Europe. Poirier *et al.* ont recensé eux-aussi ce sous-type, chez un patient. On note l'absence de ST7 dans notre étude comparée aux deux autres études. Ce résultat peut être dû à notre choix d'amorce car il semblerait que le génome de l'ARN ribosomique de ST7 présente un important polymorphisme entraînant des difficultés pour l'amplification et le génotypage (72).

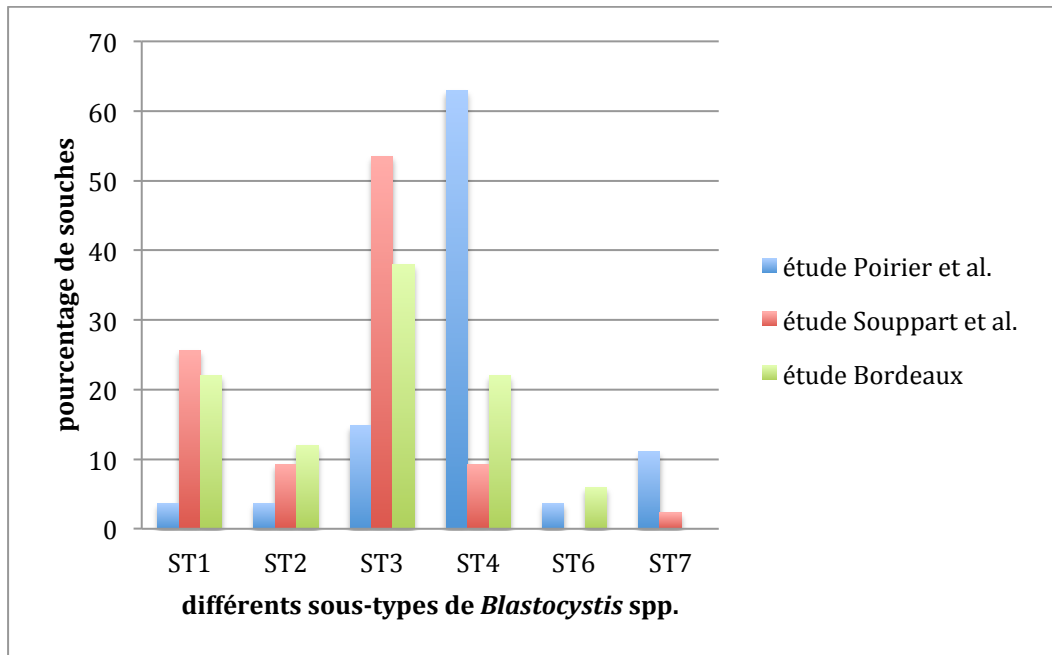
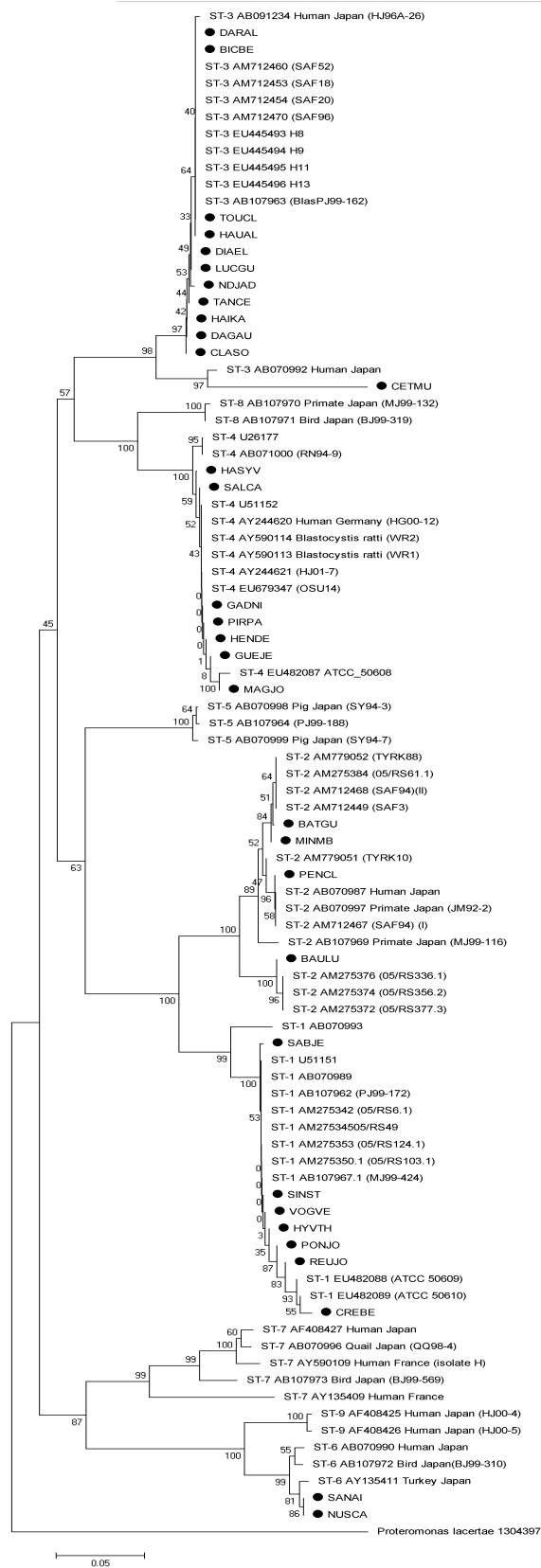


Figure 28: Répartition des souches de *Blastocystis* spp. selon les sous-types d'après trois études françaises

### 3.7.2 Réalisation d'un arbre phylogénique

Les 32 souches amplifiées et séquencées ont été comparées à la banque de données GenBank via l'interface BLAST (105), pour obtenir un arbre phylogénique représenté sur la figure 29 comprenant nos souches et des souches de références. La terminologie proposée par Stensvold *et al.* permet de classer toutes les souches en les rattachant à un flagellé proche du parasite, *Proteromonas lacertae* (9).

Cet arbre phylogénique confirme que les amorces utilisées ont été choisies judicieusement et montre la grande diversité des souches circulant au C.H.U. de Bordeaux. Les souches deux patients pour lesquels on suspecte une coinfection (CETMU, PONJO) et pour qui les séquences ont été alignées avec une faiblesse de similitude de 94%, sont classées correctement dans l'arbre confirmant le rattachement aux sous-types évoqués : ST1 pour PONJO et ST3 pour CETMU.



● patient

Figure 29: arbre phylogénique comprenant les souches isolées des 32 patients au C.H.U. de Bordeaux

### 3.8 Voyages récents

Le recueil des données est complet pour 34 patients. Sur ces 34 patients, l'identification du sous-type a pu être établie pour 25 d'entre eux : 82,3% de la population étudiée présente une notion de voyage récent (< 10 ans). Les pays chauds constituent la principale destination puisqu'ils représentent 72% des pays visités. Il s'ensuit l'Europe puis les Etats-Unis. L'Afrique est le continent le plus fréquemment cité (Bénin, Congo, Cameroun, Côte d'Ivoire, Kenya, Ouganda, Sénégal, Guinée) suivi de l'Asie (Cambodge, Inde, Indonésie, Ouzbékistan, Thaïlande, Yémen). Ces données confirment le fait que les migrants et voyageurs sont une population à risque sujette à la présence de *Blastocystis* spp. liée d'une part au climat mais surtout aux conditions d'hygiène précaires dans les pays en développement (48).

Il n'a pas été trouvé de corrélation entre les sous-types et les destinations. Comme le montre le tableau 23, les différents sous-types sont présents uniformément sur tous les continents montrant le caractère ubiquitaire du parasite. Cependant, ST4, sous-type majoritaire en France dans l'étude de Poirier *et al.* (60%), est présent chez 1 patient parasité sur 5 environ dans notre étude, retrouvé chez des patients n'ayant pas quitté l'Europe (3 cas sur 4).

| Patient | ST | Voyage récent ou lieu de résidence              |
|---------|----|---|
| HYVTH   | 1  | Tunisie 2011, Turquie 2010                      |
| REUJO   | 1  | Côte d'Ivoire jusqu'à maintenant                |
| SABJE   | 1  | Côte d'Ivoire jusqu'en 2002                     |
| SINST   | 1  | Ouganda en ce moment                            |
| VOGVE   | 1  | Inde 2010, Yémen 2009                           |
| BATGU   | 2  | Burkina Faso 2007, Etats-Unis 2010, Italie 2011 |
| BAULU   | 2  | non   |
| MINMB   | 2  | Congo (originaire et y retourne)                |
| PENCL   | 2  | Etats-Unis 2010, Ouzbékistan avril 2011         |
| BICBE   | 3  | non   |
| CETMU   | 3  | non   |
| CLASO   | 3  | Congo 2009, Thaïlande 2010                      |
| DAGAU   | 3  | Benin, Togo jusqu'en juillet 2010               |
| DARAL   | 3  | Cambodge (résidence principale)                 |
| DIAEL   | 3  | Sénégal 2005                                    |
| HAIKA   | 3  | Guinée 2010                                     |
| NDJAD   | 3  | Cameroun 2010                                   |
| TANCE   | 3  | Kenya 2010, Thaïlande 2011, Togo 2011           |
| TOUCL   | 3  | Inde 2009                                       |
| GUEJE   | 4  | non   |
| HASYV   | 4  | Europe  |
| MAGJO   | 4  | Bénin 2011                                      |
| SALCA   | 4  | Europe  |
| NUSCA   | 6  | non   |
| SANAI   | 6  | Sénégal jusqu'à 2001                            |

Tableau 23: Mise en relation des sous-types retrouvés avec les voyages récemment effectués des patients



## 4. APPROCHE CLINICO-BIOLOGIQUE

La population étudiée est celle présentant exclusivement du *Blastocystis* spp. dans les selles, soit 31 patients, afin de pouvoir interpréter les résultats et imputer ou pas telle caractéristique au parasite. Le tableau récapitulatif clinico-biologique de cette population se trouve en annexe 4.

### 4.1 Aspect des selles

L'aspect des selles de la population porteuse de *Blastocystis* spp. et de la population générale est détaillé dans la figure 30. Les selles d'aspect mou pâteux et moulé sont prépondérantes dans les deux populations. L'étude de Bourrée *et al.* rapporte 72,1% d'aspect pâteux des selles ce qui est nettement supérieur au résultat trouvé de 32%. Les selles d'aspect liquide sont peu retrouvées dans la population porteuse de *Blastocystis* spp. par rapport à la population générale. Nous en concluons que l'aspect de la selle ne permet pas de prédire la présence de *Blastocystis* spp.

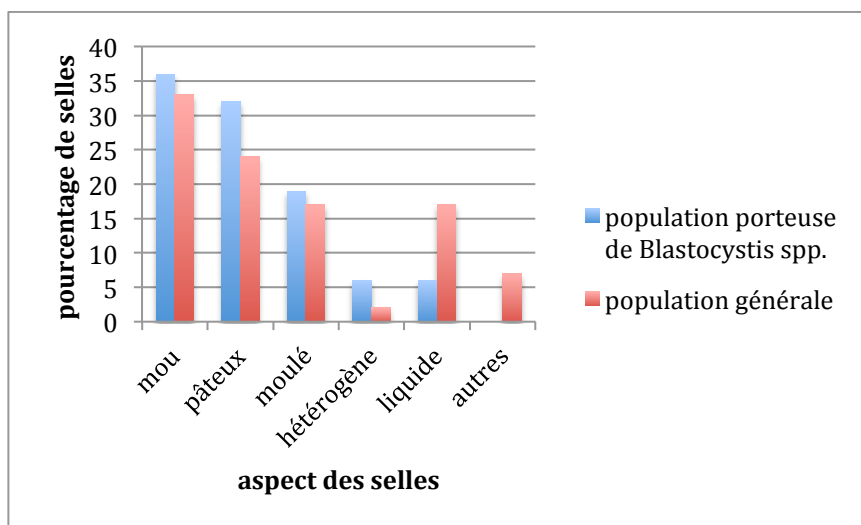


Figure 30: aspect des selles dans la population porteuse de *Blastocystis* spp. et par rapport à la population générale.

### 4.2 Syndrome inflammatoire et fièvre

Dans 70% des cas (23/33 patients renseignés), il n'existe pas de syndrome inflammatoire biologique (évalué par la CRP). Lorsqu'il a été présent, une autre étiologie a pu souvent en être responsable (tableau 24). En ce qui concerne la

fièvre, elle est associée au syndrome inflammatoire chez 4 patients dont les signes peuvent être reliés à d'autres pathologies. L'association avec de la fièvre est rarement retrouvée (47).

En conclusion, le syndrome inflammatoire et la fièvre ne sont pas retrouvés en association avec *Blastocystis* spp. Lorsqu'ils sont retrouvés, une autre cause doit être recherchée.

| Patient | Âge | Sexe | ST | Fièvre | autres causes possibles          |
|---------|-----|------|----|--------|----------------------------------|
| BARAR   | 37  | M    | NR | non    | Colite à Clostridium difficile   |
| BAULU   | 3   | M    | 2  | non    | Hépatoblastome                   |
| BRAAL   | 32  | F    | NR | non    | -                                |
| CHAGU   | 64  | M    | ET | NR     | Hémopathie                       |
| DARAL   | 62  | M    | 3  | non    | -                                |
| HASYV   | 57  | M    | 4  | oui    | DICV                             |
| HAUAL   | 60  | M    | 3  | oui    | VIH+                             |
| LUCGU   | 70  | M    | 3  | non    | POIC sur sclérodermie systémique |
| MAUJE   | 78  | M    | NR | oui    | Pathologie infectieuse biliaire  |
| TOUCL   | 26  | F    | 3  | oui    | amibiase hépatique               |

DICV : Déficit Immunitaire Commun Variable

POIC : Pseudo occlusion de l'intestin

NR : non renseigné

ET : échec technique

- : aucune

*Tableau 24: association de la fièvre chez les patients présentant un syndrome inflammatoire*

### 4.3 Signes digestifs

*Blastocystis* spp. est souvent mis en relation avec des symptômes digestifs tels que diarrhée, douleurs abdominales, perte de poids, nausées, vomissements plus ou moins associés à de la fièvre. La symptomatologie varie de la simple diarrhée à la gastro-entérite aiguë (20).

Dans notre étude, 55,2% des patients porteurs exclusivement de *Blastocystis* spp. présentent des symptômes digestifs (évalués par la présence de douleurs abdominales, diarrhée, perte de poids, nausée et vomissement), et donc 44,8% asymptomatiques, ce qui permet de dire que dans cette population, *Blastocystis* spp. n'est pas clairement associé à des signes cliniques. La population pédiatrique présente les mêmes résultats (annexe 4). De plus, les sous-types retrouvés sont répartis uniformément dans la population symptomatique et asymptomatique (tableau 25).

| Patients        | nombre total de souches | nombre de souches génotypées | ST1 | ST2 | ST3 | ST4 | ST6 |
|-----------------|-------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| symptomatiques  | 16                      | 10                           | 1   | 1   | 4   | 3   | 1   |
| asymptomatiques | 13                      | 11                           | 2   | 1   | 5   | 2   | 1   |

Tableau 25: répartition des souches de *Blastocystis* spp. chez les patients présentant ou non des signes digestifs

Cependant, si l'on observe les dossiers des patients symptomatiques du tableau 26, 10 patients sur 16 soit 63% ne possèdent pas d'étiologies évidentes à ces symptômes cliniques ce qui permet de dire que dans certains cas, *Blastocystis* spp. serait responsable de troubles digestifs. Le taux d'éosinophiles et le bilan hépatique (évalué par le dosage des ASAT, ALAT, GGT, PAL et bilirubine) restent normaux chez les patients symptomatiques.

| Patient | Âge | Sexe | ST | Signes digestifs | Bilan hépatique perturbé | Hyper-Eosinophilie (G/L) | Autres causes possibles                        |
|---------|-----|------|----|------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| BARAR   | 37  | M    | NR | oui              | non                      | -                        | MAI (maladie de Berger) transplantation rénale |
| BAULU   | 3   | M    | 2  | oui              | non                      | -                        | Hépatoblastome                                 |
| BICBE   | 11  | M    | 3  | oui              | non                      | 1,1                      | -  |
| BRAAL   | 32  | F    | NR | oui              | non                      | -                        | -  |
| GUEJE   | 77  | M    | 4  | oui              | NR                       | -                        | -  |
| HASYV   | 57  | M    | 4  | oui              | non                      | -                        | DICV   |
| HENDE   | 80  | F    | 4  | oui              | non                      | -                        | -  |
| LAUFR   | 77  | M    | NR | oui              | non                      | -                        | -  |
| LUCGU   | 70  | M    | 3  | oui              | non                      | -                        | MAI<br>Sclérodémie systémique                  |
| MAUJE   | 78  | M    | NR | oui              | oui                      | -                        | pathologie infectieuse biliaire                |
| NUSCA   | 52  | F    | 6  | oui              | non                      | -                        | -  |
| OTINO   | 7   | F    | ET | oui              | NR                       | -                        | -  |
| PONJO   | 51  | F    | 1  | oui              | non                      | -                        | -  |
| TANCE   | 22  | F    | 3  | oui              | NR                       | -                        | -  |
| TOUCL   | 26  | F    | 3  | oui              | oui                      | -                        | Amibiase hépatique                             |
| VOUAU   | 25  | F    | NR | oui              | non                      | -                        | -  |

- : négatif / aucune

NR : non réalisé

ET : Echec technique

MAI : Maladie Auto-Immune

DICV : Déficit Immunitaire Commun Variable

Tableau 26: patients présentant des signes digestifs et porteurs de *Blastocystis* spp.

## 4.4 Densité parasitaire et symptomatologie digestive

Dans la littérature, il a été suggéré que les symptômes digestifs pouvaient être liés à la densité parasitaire (34, 52, 91). Cependant, certaines études démentent cette association en n'observant aucune corrélation entre les deux (22, 62, 115). La figure 31 illustre les résultats obtenus montrant l'absence de corrélation entre la quantité de parasites et les symptômes cliniques.

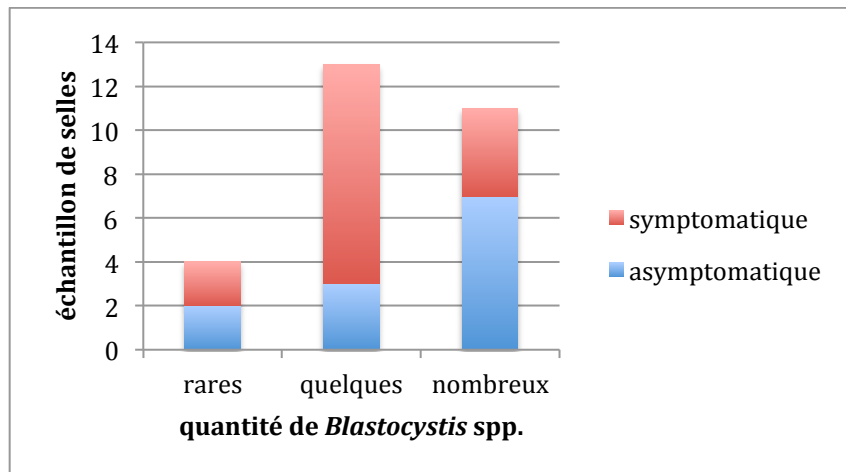


Figure 31: Quantité de *Blastocystis spp.* chez les patients symptomatiques ou non

## 4.5 Signes cutanés

Volgelberg *et al.* et Hameed *et al.* rapportent l'association du parasite avec des signes cutanés à type d'urticaire (aiguë et chronique) et de prurit (56, 57, 82). Les sous-types incriminés dans ces études sont ST2 et ST3.

Or dans notre étude, 6 patients ont présentés des signes cutanés mais 3 ont été exclus en raison des autres étiologies possibles à leur dermatose (tableau 27). Le prurit est le symptôme récurrent chez les 3 autres patients et il est intéressant de constater que ST2 et ST3 sont les sous-types présents comme énoncé dans la littérature. Donc, *Blastocystis spp.* pourrait être responsable de manifestations cutanées allergiques.

La patient SALCA, porteuse de ST4 et n'ayant voyagé qu'en Europe, présente un eczéma traité uniquement par une crème hydratante. Le fait de traiter pour éradiquer le parasite, pourrait peut être éliminer l'eczéma.

L'hyperéosinophilie est présente chez 2 patients, l'un présentant une filariose et l'autre une maladie auto-immune ; deux causes probables à l'hyperéosinophilie. Notre recrutement ne contenait pas de patients ayant consulté en dermatologie donc nous n'avons pas pu corrélérer la présence de *Blastocystis* spp. au syndrome urticarien. Il serait judicieux de proposer au service de Dermatologie une nouvelle étude prospective avec un EPS en systématique chez les patients présentant des manifestations cutanées allergiques.

| Patient | Âge | sexe | ST | Signes cutanés         | Signes digestifs | Hyper-éosinophilie (G/L) | Autres causes possibles                     |
|---------|-----|------|----|------------------------|------------------|--------------------------|---|
| BAULU   | 3   | M    | 2  | Prurit                 | oui              | -                        | -   |
| CLASO   | 26  | F    | 3  | Urticaire chronique    | non              | 1,47                     | filariose                                   |
| HAIKA   | 19  | M    | 3  | Prurit                 | non              | 1,3                      | Maladie auto-immune<br>Syndrome néphrotique |
| NDJAD   | 34  | F    | 3  | Prurit                 | non              | -                        | filariose                                   |
| OTINO   | 7   | F    | ET | Prurit après la douche | oui              | -                        | -   |
| SALCA   | 20  | F    | 4  | Prurit                 | non              | -                        | terrain atopique : eczema                   |

ET : échec technique

*Tableau 27: Patients porteurs de Blastocystis spp. et présentant des signes cutanés associés ou non à des troubles digestifs.*

## 4.6 Traitement

Le médicament de choix est le métronidazole FLAGYL<sup>®</sup>. Il a montré son efficacité dans de nombreuses études (90, 91) mais des cas de résistance ont été publiés (92-94). Le triméthoprime-sulfaméthoxazole BACTRIM<sup>®</sup> paraît être une bonne alternative thérapeutique (95).

Sur 47 patients positifs à *Blastocystis* spp., 18 ont été traités dont 15 patients par FLAGYL<sup>®</sup>. Le BACTRIM<sup>®</sup> a été utilisé chez deux patients mais dans un but préventif pour l'un (patient BAULU) en raison de son hépatoblastome et d'éradication de *C. cayetanensis* pour l'autre (patient VINJE).

Un cas intéressant est celui du patient GUEJE porteur de ST4 surligné en rose dans l'annexe 5. Ce patient a présenté des selles positives à *Blastocystis* spp. de mars 2011 à juin 2011, malgré plusieurs lignes de traitement conduites. Il a présenté des symptômes digestifs sans pathologie associée et a été traité par FLAGYL<sup>®</sup> en premier intention. Cependant, devant la persistance des signes cliniques et la présence du parasite dans les selles, une deuxième ligne thérapeutique est instaurée avec du tinidazole FASIGYNE<sup>®</sup> émettant l'hypothèse

d'une souche résistante. Devant l'inactivité du traitement un troisième schéma thérapeutique a été instauré associant le tinidazole à la doxycycline. Une réponse thérapeutique est enfin obtenue avec une négativation de l'EPS.

Une étude menée par Mirza *et al.* rapporte une sensibilité variable du ST4 au FLAGYL® ce qui pourrait expliquer cette absence de réponse thérapeutique. De plus, il est fréquent d'avoir des résistances croisées entre molécule de la même famille ce qui est le cas pour le métronidazole et le tinidazole expliquant l'échec de la deuxième ligne thérapeutique. La doxycycline est rarement employée et décrite comme inefficace *in vitro* contre *Blastocystis* spp. (93). Cependant elle a permis, associée au tinidazole, la régression des symptômes et la négativation de l'EPS chez ce patient.

Mis à part ce patient, aucun suivi d'efficacité de traitement n'a été rapporté à ce jour. Il serait intéressant de continuer l'étude pour noter l'amélioration clinique avec ou sans traitement et la négativation de l'EPS.

## 5. SYNTHÈSE DE L'ÉTUDE

*Blastocystis* spp. est le parasite le fréquemment rencontré dans les selles. Il est souvent retrouvé à Bordeaux, chez les voyageurs. Nous confirmons la présence de *Blastocystis* spp. aussi bien chez les patients présentant une symptomatologie digestive que chez les patients asymptomatiques. Dans 34% des cas, il est associé à un autre parasite. Cependant, il a été la seule étiologie retrouvée dans 63% des cas. Les signes cutanés à type d'urticaire ou prurit pourraient être, eux aussi, une manifestation clinique de la présence du parasite. Nous observons que chez deux patients, *Blastocystis* spp. est le seul point d'appel permettant d'expliquer les manifestations cutanées. Cette hypothèse reste à confirmer par une étude prospective menée en collaboration avec le service de dermatologie. Toutefois, il serait utile d'inclure dans l'exploration d'un syndrome urticarien ou d'un prurit un EPS en systématique.

Les patients immunodéprimés ont présenté dans 80% des cas une symptomatologie digestive. Il serait certainement nécessaire pour ces patients d'instaurer un traitement antiparasitaire en systématique. La population pédiatrique présente des symptômes dans la moitié des cas. Si aucune autre

étiologie n'est trouvée, il serait nécessaire d'initier un traitement avec un antiparasitaire ou bien l'Ultralevure®.

Le génotypage du *Blastocystis* spp. aurait sa place dans le diagnostic biologique car il permet d'identifier le sous-type incriminé et ainsi déterminer le traitement approprié, certains sous-types ayant une sensibilité variable (ST4) voire une résistance (ST7) au traitement de choix, le FLAGYL®.

## 6. CONDUITE A TENIR DEVANT LA PRESENCE DE *BLASTOCYSTIS* SPP.

Avec toutes ces données, il est possible de proposer un arbre décisionnel sur la conduite à tenir devant la présence de *Blastocystis* spp. à l'EPS (figure 32).

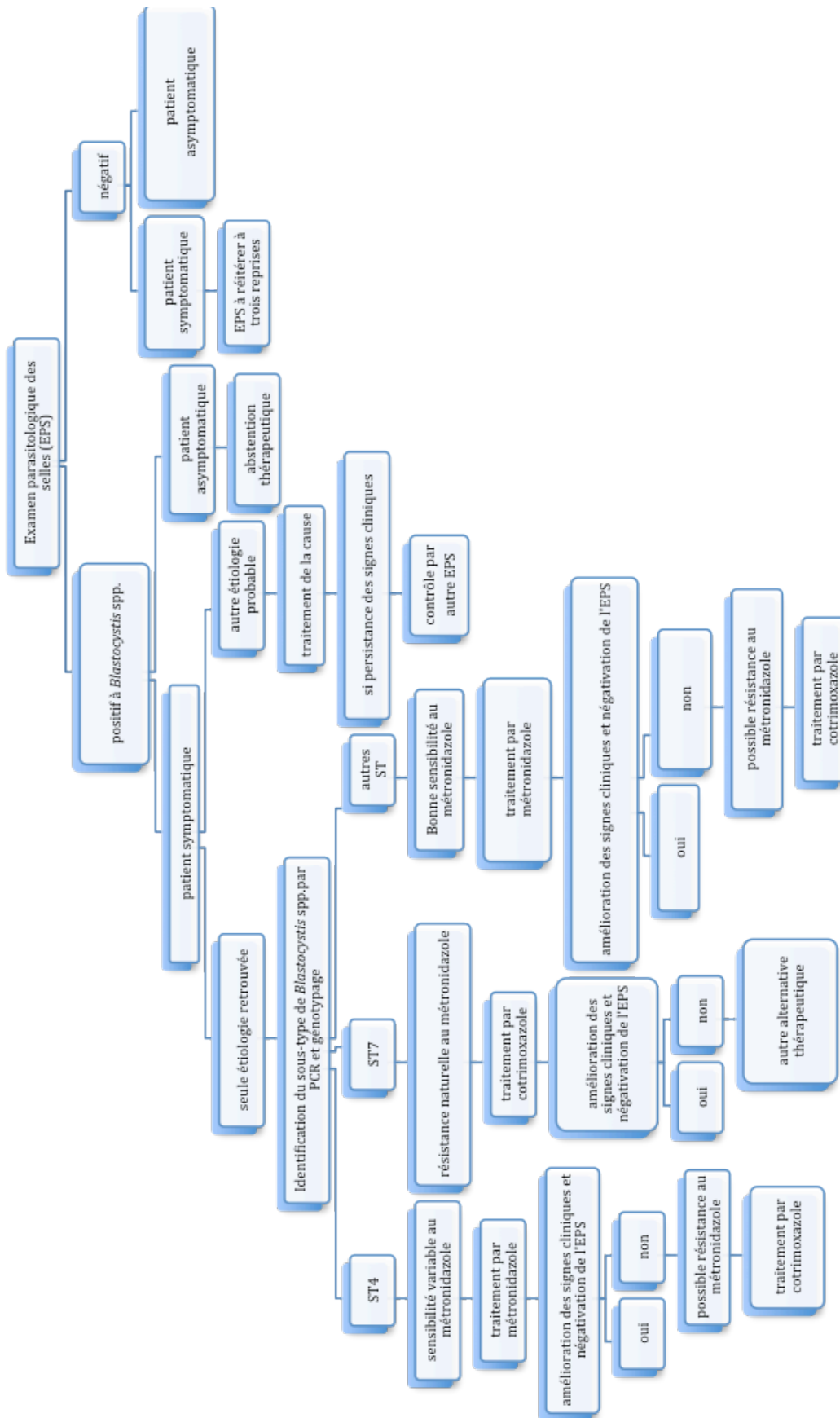


Figure 32: proposition d'un arbre décisionnel sur la conduite à tenir devant un EPS positif à Blastocystis spp.



# CONCLUSION

*Blastocystis* spp. demeure un parasite énigmatique par ses différentes formes, modes de reproduction et cycle parasitaire. La mise au point de la technique de PCR conventionnelle nous a permis d'identifier les souches circulant au CHU de Bordeaux avec ST3 le plus fréquent puis ST1 et ST4 et enfin ST2 et ST6. Néanmoins, la sensibilité obtenue par cette technique pourrait être améliorée par le développement de la PCR en temps réel qui, en plus d'être d'une grande sensibilité, est très rapide et permet de détecter les coinfections. L'arbre phylogénique a permis de situer les différentes souches les unes par rapport aux autres selon la classification de Stensvold *et al.* montrant la diversité génétique de ce parasite.

Notre étude prospective a permis de mettre en avant la présence de *Blastocystis* spp. dans les selles de patients symptomatiques ou non. Toutefois, certains patients ont présenté des signes digestifs ou cutanés sans autre étiologie apparente c'est pourquoi le traitement serait indiqué chez ces patients.

L'identification en routine du sous-type, par génotypage, permettrait de choisir le traitement approprié en raison du profil de résistance de certains sous-types (ST4 et ST7). Le métronidazole FLAGYL® reste le médicament le plus efficace contre *Blastocystis* spp. mais peut entraîner, en cas de résistance, un échec thérapeutique. C'est pourquoi le BACTRIM®, la nitazoxanide, la paromomycine associée ou non au FLAGYL®, l'ULTRALEVURE® sont des alternatives thérapeutiques au traitement standard. L'arbre décisionnel sur la conduite à tenir devant un EPS positif à *Blastocystis* spp. orientera les cliniciens vers un traitement ou bien une abstention thérapeutique.

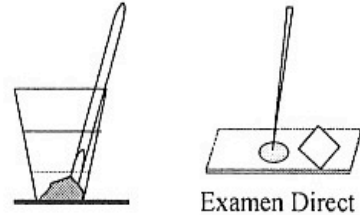
# ANNEXE 1

## Technique de BAILENGER Méthode diphasique: Acéto-Acétique / Ether

### 1- Dilution homogène

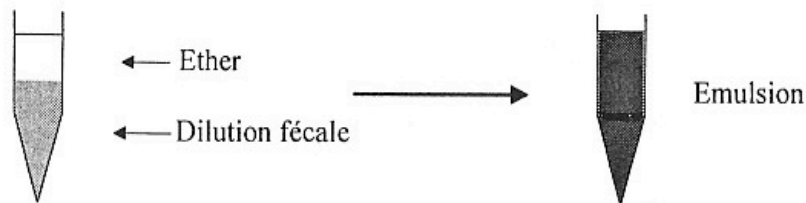
Selles + Acéto-Acétique

- Prédilution : 1 goutte pour Examen Direct
- Poursuivre la dilution
- Laisser sédimenter 10 à 30 sec les gros débris

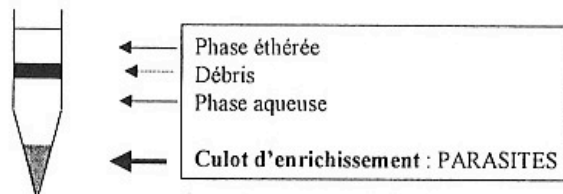


Examen Direct

### 2- Emulsionner : oblitérer l'orifice avec le pouce et agiter vivement Dilution fécale + Ether

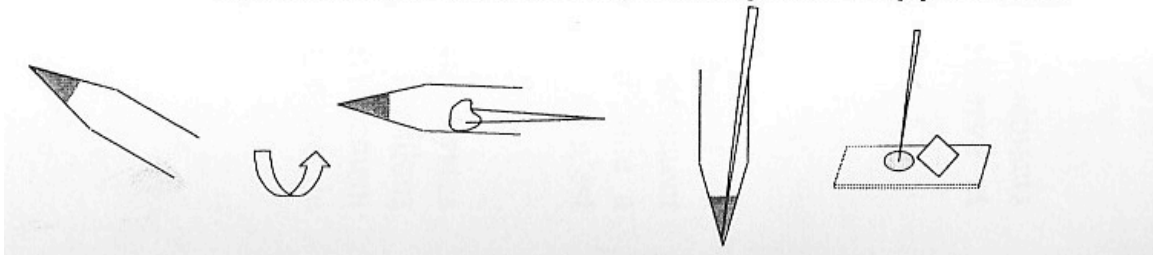


### 3- Centrifuger 3 mn à 2500 trs/min : 4 couches se superposent



### 4- Isolement du culot de centrifugation

- Décoller l'anneau de débris avec les mors d'une pince.
- Eliminer d'un geste sec les 2 phases liquides et l'anneau
- Remettre rapidement le tube à l'horizontale
- Passer un tampon de coton sur les parois internes du tube
- Agiter le tube pour remettre en suspension et prélever à la pipette Pasteur



## ANNEXE 2

GCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA GATTAAGCC  
ATGCATGTGTAAGTATAAATATTTAACTTTGAAACTGCGAATGGCTCATTATAT  
CAGTTATAGTTTATTTGATGAAAAGTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAG  
AGCTAATACATGATAAAATCCTCGACTTTGAAGAGGTGTATTTATTAGAATGAA  
ACCAATAGACTTCGGTCTGTTTGTGAGTAATAATAACTAATCGTATCGCATGC  
TTAGGTAGCGATATGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGT  
GTATTGGACTACCATG GCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTC  
GGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCG  
CGTAAATTACCCAATCCTGACATAG GGAGGTAGTGACAATAAATCACAATGCG  
GAACTATTAGTTTTGCAATTGGATTGAGAACAAATGTACAAATGTTATCGATAAA  
CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATA  
CGGTATATTAAC GTTGTTCAGTTAAAAGCTC GTAGTTGAATTGAAGTGAAC  
TTGGGTTGATGTGATCTTCGGATGACATGAATCAAAGTTGACTCTTTCCAAG  
TCAATACATTGGTATTCATTTATCTTTGTATTGTGTTTGGTCATTTACTGTGAG  
AAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGACGTTTGTGTTGAATACATTAGCATGGAATAAT  
CATATATGGCTTTCATGTTGATTTGATTGTTTGAATATGGAAGCAAGATTA  
AGGGACAGTTGGGGTATTCATATTCATAGTCAGAGGTGAAATTCTGGGAT  
TTATGGAAGATGAACAAGTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCAATTAATC  
AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGAGGAT TAGATACCCTCGTAGTCTTAAC  
TATAACGATACCGACTAGGGGTTAGTAATGGTCATTGTGTGTTTACTAGTAC  
CTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCT  
GAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGC  
TTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACATAGGAAGGATA  
GACAGAACAAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTT  
AGTTGGTGGATTGATTTGTCAGGCTAATTCCGATAACGAACGAGACCTCCTC  
CTACTAAATAGATATATATATCTTTGGATATATTGTATCTTCTTAGAGGGACAC  
TATACACAAAGTGTAGGGAAAGCTGGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTT  
AGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGGACACTGATTGATTCAACAAGTAGCTGG  
GTCGAGAGACTTGGCAACTCTTTTAAAATCAATCGTGATGGGGATTGATGTT  
TGTAATCATCATCATGAACGAGGAATTCCTAGTAAATGCAAGTCATCAACTTG  
CGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCCGTCGCACCTACCGATT  
GAATGGTCCGATGAACACTTTGGATTTTGTATAGTAATTCTTTGCGGAATTAT  
TCTATTGAAAGAAGTTGTGTAATCTTACCATTTAGAGGAAGGTGAAGTCGTA  
ACAAGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA

Amorces choisies (Stensvold *et al.* 2007)

Amorces utilisées par Soupart *et al.* 2009

Amorces utilisées par Poirier *et al.* 2011

Amorces utilisées par Jones *et al.* 2009

Amorces utilisées par Santin *et al.* 2005

# ANNEXE 3

## FICHE BIOLOGIQUE DE NOTIFICATION EN CAS DE PRESENCE DE *BLASTOCYSTIS SP.* DANS LES SELLES

### 1) Le patient

NOM : .....

Prénom : .....

N° SIGMA : .....

Date de naissance : ...../...../.....

Sexe :  M  F

### 2) L'échantillon

N° DOSSIER : .....

DATE DU PRELEVEMENT : ..... / ..... / .....

ASPECT DES SELLES :

- |                                    |                                   |  |                                     |                                    |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> moulés    | <input type="checkbox"/> glaireux | <input type="checkbox"/> dur           | <input type="checkbox"/> hétérogène | <input type="checkbox"/> sanglant  |
| <input type="checkbox"/> pâteux    | <input type="checkbox"/> soufflé  | <input type="checkbox"/> glaires pures | <input type="checkbox"/> mou        | <input type="checkbox"/> liquide   |
| <input type="checkbox"/> prés sang | <input type="checkbox"/> mastique | <input type="checkbox"/> brun clair    | <input type="checkbox"/> brun foncé | <input type="checkbox"/> jaune or  |
| <input type="checkbox"/> ocre      | <input type="checkbox"/> décoloré | <input type="checkbox"/> noir          | <input type="checkbox"/> verdâtre   | <input type="checkbox"/> rougeâtre |

CYTOLOGIE :

- hématies  leucocytes  cristaux de Charcot

ESTIMATION DE LA QUANTITE DE BLASTOCYSTIS :

- rares  
 quelques  
 assez nombreux  
 nombreux  
 très nombreux

RESULTAT DU SEQUENCAGE :

.....

AUTRE PARASITE ASSOCIE :  Oui  Non

Si OUI, lequel? .....

### 3) La biologie

Bilan inflammatoire :

- CRP : .....

Bilan hépatique :

- ASAT : .....

- ALAT : .....

- PAL : .....

- GGT : .....

- Bilirubine : .....

Recherche positive de virus dans les selles :  Oui  Non

Si Oui, préciser : .....

Recherche positive de bactéries entéropathogènes :  Oui  Non



# ANNEXE 4

| Patient | Âge | Sexe | ST | Signes digestifs | Fièvre | Signes cutanés            | Hypertensi<br>nophillie | Sd<br>inflammatoire | Bilan<br>hépatique<br>perturbé | HospIT | Pathologies<br>associées         | Immuno-<br>dépression | CorticoT<br>ImmunoS<br>chimio | traitement  |
|---------|-----|------|----|------------------|--------|---------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|--------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---|
| BARAR   | 37  | 1    | NR | oui              | non    | non                       | non                     | oui                 | non                            | oui    | MAI (transplanté rénéale)        | oui                   | oui                           | Flagyl®   |
| BAULU   | 3   | 1    | 2  | oui              | non    | Prurit                    | non                     | oui                 | non                            | oui    | Hépatoblastose                   | oui                   | oui                           | Il préventif BACTRIM  |
| BETSY   | 41  | 2    | QI | NR               | non    | non                       | NR                      | NR                  | NR                             | non    | NR                               | NR                    | NR                            | non   |
| BICBE   | 11  | 1    | 3  | oui              | non    | NR                        | 1,1                     | non                 | non                            | non    | non                              | non                   | non                           | non   |
| BRAAL   | 32  | 2    | NR | oui              | non    | non                       | non                     | oui                 | non                            | non    | non                              | non                   | non                           | Flagyl® et Intérix®   |
| CLASO   | 26  | 2    | 3  | non              | non    | Urticaire chronique       | 1,47                    | non                 | non                            | non    | Filariose                        | non                   | non                           | Stromectol®, Zentax®<br>Flagyl®                                   |
| DAGAU   | 4   | 1    | 3  | NR               | non    | non                       | NR                      | NR                  | NR                             | non    | NR                               | NR                    | NR                            | non   |
| DIAEL   | 18  | 2    | 3  | non              | non    | non                       | NR                      | NR                  | NR                             | non    | non                              | non                   | non                           | non   |
| ERLSA   | 41  | 2    | QI | non              | non    | non                       | NR                      | NR                  | NR                             | NR     | NR                               | NR                    | NR                            | Flagyl® Loperamide<br>puis Faalgine® puis<br>Doxycycline+Faalgine |
| GUEJE   | 77  | 1    | 4  | oui              | non    | non                       | non                     | NR                  | NR                             | non    | non                              | non                   | non                           | non   |
| HAIKA   | 19  | 1    | 3  | non              | non    | Prurit                    | 1,3                     | non                 | non                            | oui    | MAI (syndrome néphrotique)       | non                   | non                           | Stromectol®   |
| HAMMO   | 27  | 1    | NR | NR               | NR     | NR                        | NR                      | NR                  | NR                             | non    | Fièvre méditerranéenne familiale | non                   | inhibiteur IL-1               | NR  |
| HASYV   | 57  | 1    | 4  | oui              | oui    | non                       | non                     | oui                 | non                            | oui    | DICV                             | oui                   | Ig polyvalente                | non   |
| HAUAL   | 60  | 1    | 3  | non              | oui    | Eruption cutanée atypique | 2,03                    | oui                 | oui                            | oui    | VH+                              | non                   | non                           | Stromectol®   |
| HENDE   | 80  | 2    | 4  | oui              | non    | non                       | non                     | non                 | non                            | oui    | non                              | non                   | non                           | Flagyl®   |
| HYVTH   | 21  | 1    | 1  | non              | non    | non                       | NR                      | NR                  | NR                             | non    | non                              | non                   | non                           | Non   |
| LAUFR   | 77  | 1    | NR | oui              | non    | non                       | non                     | non                 | non                            | non    | non                              | non                   | non                           | Flagyl®   |
| LUCGU   | 70  | 1    | 3  | oui              | non    | non                       | non                     | oui                 | non                            | oui    | MAI (acnéidermie systémique)     | oui                   | Endoxan® et<br>corticoïdes    | non   |
| MAUJE   | 78  | 1    | NR | oui              | oui    | non                       | non                     | oui                 | oui                            | oui    | pathologie infectieuse biliaire  | non                   | non                           | non   |
| NDJAD   | 34  | 2    | 3  | non              | non    | prurit                    | non                     | non                 | non                            | non    | Filariose                        | non                   | non                           | Soluzined®+<br>Stromectol®  |
| NIUSCA  | 52  | 2    | 5  | oui              | non    | non                       | non                     | non                 | non                            | non    | non                              | non                   | non                           | Flagyl® +Narcomel®<br>(infection urinaire)                        |
| OTINO   | 7   | 2    | NE | oui              | non    | Prurit après la douche    | NR                      | NR                  | NR                             | non    | non                              | non                   | non                           | Flagyl stop®  |
| PENCL   | 78  | 2    | 2  | non              | non    | non                       | non                     | non                 | NR                             | oui    | Lymphome il y a 10 ans           | non                   | non                           | non   |
| PIRPA   | 49  | 1    | 4  | non              | non    | non                       | non                     | non                 | oui                            | oui    | MAI (Wegener)                    | oui                   | oui                           | non   |
| PONUO   | 51  | 2    | 1  | oui              | non    | non                       | non                     | non                 | non                            | oui    | non                              | non                   | non                           | (transplantation)   |
| SALCA   | 20  | 2    | 4  | non              | non    | prurit                    | NR                      | NR                  | NR                             | non    | Terrain atopique: eczéma         | non                   | non                           | non   |
| SANAI   | 23  | 2    | 5  | non              | non    | non                       | NR                      | NR                  | NR                             | non    | non                              | non                   | non                           | non   |
| SINST   | 57  | 1    | 1  | non              | non    | non                       | 0,72                    | non                 | NR                             | non    | non                              | non                   | non                           | non   |
| TANCE   | 22  | 2    | 3  | oui              | non    | non                       | NR                      | NR                  | NR                             | non    | non                              | non                   | non                           | Flagyl®   |
| TOUCL   | 26  | 2    | 3  | oui              | oui    | non                       | non                     | oui                 | oui                            | oui    | Ambiasse hépatique               | non                   | non                           | Flagyl®, Intérix®   |
| VOUAV   | 25  | 2    | NR | oui              | non    | non                       | non                     | non                 | non                            | oui    | Polyarthralgies                  | non                   | non                           | non   |

MAI maladie auto-immune  
 NR non renseigné  
 NE non effectué  
 QI quantité insuffisante  
 DICV déficit immunitaire commun variable

# ANNEXE 5

| Patient | Âge | Sexe | ST | Parasite associé   | Signes digestifs | Traitement Blastocystis spp.   | Traitement associé                                     |
|---------|-----|------|----|--|------------------|--|--|
| BARAR   | 37  | M    | NR | -  | oui              | FLAGYL®  | ORBENINE®  |
| BATGU   | 24  | M    | 2  | <i>S. mansoni</i>  | non              | -  | BILTRICIDE®  |
| BAULU   | 3   | M    | 2  | -  | oui              | BACTRIM® (préventif)   | -  |
| BETSY   | 41  | F    | QI | -  | NR               | -  | -  |
| BICBE   | 11  | M    | 3  | -  | oui              | -  | -  |
| BRAAL   | 32  | F    | NR | -  | oui              | FLAGYL®  | INTETRIX®  |
| CETMU   | 19  | F    | 3  | <i>E. coli</i>   | oui              | -  | -  |
| CHAGU   | 64  | M    | ET | <i>E. hominis</i><br><i>E. nanus</i>                         | NR               | -  | -  |
| CLASO   | 26  | F    | 3  | <i>E. coli</i>   | non              | FLAGYL®  | STROMECTOL®<br>ZENTEL®                                 |
| CREBE   | 67  | M    | 1  | <i>P. bütschlii</i><br><i>E. coli</i><br><i>E. hartmanni</i> | oui              | FLAGYL®  | -  |
| DAGAU   | 4   | M    | 3  | -  | NR               | -  | -  |
| DALCH   | 61  | M    | NR | <i>D. dentriticum</i>  | oui              | -  | -  |
| DARAL   | 62  | M    | 3  | <i>E. nanus</i>  | non              | -  | -  |
| DIAEL   | 18  | F    | 3  | -  | non              | -  | -  |
| DRARE   | 15  | F    | NR | <i>E. vermicularis</i>                                       | non              | -  | -  |
| ERLSA   | 41  | F    | QI | -  | non              | -  | -  |
| GADNI   | 19  | M    | 4  | <i>E. nanus</i>  | non              | -  | STROMECTOL® gâle<br>INTETRIX®                          |
| GUEJE   | 77  | M    | 4  | -  | oui              | 1 FLAGYL® et lopéramide<br>2 FASIGYNE®<br>3 FASIGYNE® et doxycycline | -  |
| HAIKA   | 19  | M    | 3  | -  | non              | -  | STROMECTOL®  |
| HAMMO   | 27  | M    | NR | -  | NR               | NR   | NR   |
| HASYV   | 57  | M    | 4  | -  | oui              | -  | -  |
| HAUAL   | 60  | M    | 3  | -  | non              | -  | STROMECTOL®<br>épanchement pleural                     |
| HENDE   | 80  | F    | 4  | -  | oui              | FLAGYL®  | -  |
| HYVTH   | 21  | M    | 1  | -  | non              | -  | -  |
| JASJE   | 40  | M    | ET | <i>A. duodenale</i>  | oui              | FLAGYL®  | ZENTEL®  |
| LAUFR   | 77  | M    | NR | -  | oui              | FLAGYL®  | -  |
| LUCGU   | 70  | M    | 3  | -  | oui              | -  | -  |
| MAGJO   | 52  | F    | 4  | <i>E. nanus</i>  | oui              | -  | Probabiliste:<br>STROMECTOL®<br>BILTRICIDE®<br>ZENTEL® |
| MAUJE   | 78  | M    | NR | -  | oui              | -  | -  |
| MINMB   | 16  | F    | 2  | <i>E. nanus</i><br><i>E. coli</i>                            | oui              | FLAGYL®  | INTETRIX®  |
| NDJAD   | 34  | F    | 3  | -  | non              | -  | STROMECTOL®  |
| NUSCA   | 52  | F    | 6  | -  | oui              | FLAGYL®  | NOROXINE®  |
| OTINO   | 7   | F    | ET | -  | oui              | FLAGYL®  | -  |
| PENCL   | 78  | F    | 2  | -  | non              | -  | -  |
| PIRPA   | 49  | M    | 4  | -  | non              | -  | -  |
| PONJO   | 51  | F    | 1  | -  | oui              | -  | -  |
| RASFL   | 2   | F    | NR | <i>G. duodenalis</i>   | Nr               | -  | -  |
| REUJO   | 61  | F    | 1  | <i>E. nanus</i>  | oui              | FLAGYL®  | INTETRIX®  |
| SABJE   | 70  | M    | 1  | <i>E. nanus</i><br><i>D. fragilis</i><br><i>E. hartmanni</i> | non              | -  | STROMECTOL®<br>ZENTEL®                                 |
| SALCA   | 20  | F    | 4  | -  | non              | -  | -  |
| SANAI   | 23  | F    | 6  | -  | non              | -  | -  |
| SINST   | 57  | M    | 1  | -  | non              | FLAGYL®  | -  |
| TANCE   | 22  | F    | 3  | -  | oui              | FLAGYL®  | -  |
| TOUCL   | 26  | F    | 3  | -  | oui              | FLAGYL®  | INTETRIX®  |
| VINJE   | 61  | M    | ET | <i>C. cayetanensis</i>                                       | oui              | -  | BACTRIM®<br><i>C. cayetanensis</i>                     |
| VOGVE   | 46  | F    | 1  | <i>E. nanus</i>  | oui              | FLAGYL®  | -  |
| VOUAU   | 25  | F    | NR | -  | oui              | -  | -  |

NR : non réalisé

ET : échec technique

QI : quantité insuffisante

- : absence

# BIBLIOGRAPHIE

1. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp.* Clin Microbiol Rev. 2008 Oct;21(4):639-65.
2. Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol. 2005 Jan;43(1):348-55.
3. Van Gool T. *Blastocystis*, new insights in frequently observed intestinal parasite. ESCMID; Amsterdam 2010. p. 17-31.
4. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano TA, Hasegawa M. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 2002 Jan-Feb;49(1):42-53.
5. Bourrée P. *Blastocystis* : commensal ou pathogène? étude de 590 cas et revue de la littérature. Antibiotiques. 2007(9):20-4.
6. Tan KS. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. Vet Parasitol. 2004 Dec 9;126(1-2):121-44.
7. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*--past and future. Clin Microbiol Rev. 1991 Jan;4(1):61-79.
8. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 1996 Apr 4;380(6573):398.
9. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark, CG. Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. Trends Parasitol. 2007 Mar;23(3):93-6.
10. Sogin ML, Silberman JD. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. Int J Parasitol. 1998 Jan;28(1):11-20.
11. Clark CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol Biochem Parasitol. 1997 Jul;87(1):79-83.
12. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi, Y Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. J Clin Microbiol. 2000 Apr;38(4):1324-30.
13. Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, Hossain MB, Zaman V, Haque R, Takahashi, Y. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. Parasitol Res. 2004 Jan;92(1):22-9.
14. Suresh KG, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004 Jun;23(6):509-11.
15. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clin Microbiol Rev. 2002 Jul;15(3):329-41.
16. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, Morris K, Thompson, RC. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. Parasitology. 2007 Mar;134(Pt 3):359-67.
17. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Nov;59(3):303-7.
18. Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. Parasitol Res. 2007 Jun;101(1):43-51.



19. Tan KS, Ng GC, Quek E, Howe J, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M. *Blastocystis hominis*: A simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Exp Parasitol*. 2000 Sep;96(1):9-15.
20. Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis spp*. *Curr Infect Dis Rep*. 2010 Jan;12(1):28-35.
21. Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res*. 1997;83(1):60-3.
22. Zierdt CH, Williams RL. *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Exp Parasitol*. 1974 Oct;36(2):233-43.
23. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Oct;9(4):563-84.
24. Puthia MK, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryot Cell*. 2008 Mar;7(3):435-43.
25. Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK. Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 1999 Dec;85(12):974-6.
26. Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res*. 2006 Feb;98(3):189-93.
27. Suresh KG, Venilla GD, Tan TC, Rohela M. In vivo encystation of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 2009 Jun;104(6):1373-80.
28. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Yap EH. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitol Res*. 1999 Feb;85(2):103-8.
29. Stenzel DJ, Lee MG, Boreham PF. Morphological differences in *Blastocystis* cysts—an indication of different species? *Parasitol Res*. 1997;83(5):452-7.
30. Zhang X, Zhang S, Qiao J, Wu X, Zhao L, Liu Y, Fan X. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 2011 Aug 16.
31. Tan KS, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *Int J Parasitol*. 2002 Jun 15;32(7):789-804.
32. Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 1995;81(5):446-50.
33. Tan TC, Suresh KG. Evidence of plasmotomy in *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. 2007 Nov;101(6):1521-5.
34. Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur J Epidemiol*. 1999 Apr;15(4):389-93.
35. Zuel-Fakkar NM, Abdel Hameed DM, Hassanin OM. Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticaria: a case-control study. *Clin Exp Dermatol*. 2011 Jul 25.
36. Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, Steinmann P, Utzinger J, Tong XM, Chen SH, Zhou XN. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res*. 2007 Dec;102(1):83-90.
37. Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res*. 2009 Aug;105(2):413-21.
38. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):975-83.
39. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol*. 2009 Mar;39(4):473-9.

40. Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol*. 2004 Mar 25;120(3):235-42.
41. Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis spp.* from humans and animals. *Parasitol Res*. 2011 Jul;109(1):205-12.
42. Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, Chen G, Zhang R, Hou Z, Luo X. *Blastocystis sp.* subtype 5: a possibly zoonotic genotype. *Parasitol Res*. 2007 Nov;101(6):1527-32.
43. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, De-Cas E, Viscogliosi E. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res*. 2010 Jan;106(2):505-11.
44. Hailemariam G, Kassu A, Abebe G, Abate E, Damte D, Mekonnen E, Ota F. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a teaching hospital, Ethiopia. *Jpn J Infect Dis*. 2004 Apr;57(2):41-3.
45. Leelayoova S, Siripattanapibong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. Drinking water: a possible source of *Blastocystis spp.* subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Sep;79(3):401-6.
46. WHO. Guidelines for drinking-water quality, World health Organization. fourth edition, 2011.
47. Kuo HY, Chiang DH, Wang CC, Chen TL, Fung CP, Lin CP, Cho WL, Liu CY. Clinical significance of *Blastocystis hominis*: experience from a medical center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008 Jun;41(3):222-6.
48. Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. Blastocystosis: an emerging or re-emerging potential zoonosis? *Vet Ital*. 2008 Oct-Dec;44(4):679-84.
49. Cegielski JP, Msengi AE, Dukes CS, Mbise R, Redding-Lallinger R, Minjas JN, Shao J, Durack DT. Intestinal parasites and HIV infection in Tanzanian children with chronic diarrhea. *AIDS*. 1993 Feb;7(2):213-21.
50. Gassama A, Sow PS, Fall F, Camara P, Gueye-N'diaye A, Seng R, Samb B, M'Boup S, Aidara-Kane A. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int J Infect Dis*. 2001;5(4):192-8.
51. Londono AL, Mejia S, Gomez-Marin JE. Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from the urban area of Calarca, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2009 Jan-Feb;11(1):72-81.
52. Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Arikan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazitoloj Derg*. 2007;31(3):184-7.
53. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect*. 2009 Nov;137(11):1655-63.
54. Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M, Scalise G. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999 Jun;18(6):436-9.
55. Tungtrongchitr A, Manatsathit S, Kositchaiwat C, Ongrotchanakun J, Munkong N, Chinabutr P, Leelakusolvong S, Chaicumpa W. *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004 Sep;35(3):705-10.
56. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzen A, Stopsack K, Heinrich-Grafe U, Pohlmann C. *Blastocystis sp.* subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitol Int*. 2010 Sep;59(3):469-71.
57. Hameed DM, Hassanin OM, Zuel-Fakkar NM. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. *Parasitol Res*. 2010 Mar;108(3):553-60.
58. Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis sp.* subtype 3. *Acta Derm Venereol*. 2008;88(1):80-1.
59. Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Oct;65(4):393-6.

60. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res.* 2006 Oct;99(5):597-601.
61. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res.* 2008 Apr;102(5):853-60.
62. Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int.* 2008 Sep;57(3):300-6.
63. Lautié R. Approche du diagnostic différentiel du syndrome hémorragique intestinal chez les bovins. Thèse de l'école vétérinaire d'Alfort; 2011.
64. Solaymani-Mohammadi S, Singer SM. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol.* 2010 Nov;126(3):292-7.
65. Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, Kimata I. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int.* 2007 Jun;56(2):107-12.
66. Long HY, Handschack A, Konig W, Ambrosch A. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitol Res.* 2001 Dec;87(12):1029-30.
67. Mirza H, Tan KS. *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res.* 2009 Jan;104(2):355-61.
68. ANAES. Indications des examens de selles chez l'adulte. *Gastroenterol Clin Biol.* 2003;27:627-42.
69. Guy M, Cabannes A, Lucchese G. Diagnostic parasitologique, techniques et identifications. Cours de Parasitologie, Université de Pharmacie Victor Segalen Bordeaux 2.
70. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, Mungthin M. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res.* 2004 Aug;93(6):445-7.
71. Allen AV, Ridley DS. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J Clin Pathol.* 1970 Sep;23(6):545-6.
72. CNRS. Epidémiologie et pathogénie du protozoaire *Blastocystis spp.* site internet : <http://lmge-bpclermont.fr/spip.php?rubrique36>.
73. Rivera WL, Tan MA. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates in the Philippines by riboprinting. *Parasitol Res.* 2005 Jun;96(4):253-7.
74. Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A, Noonai A, Leelayoova S. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):967-75.
75. Ameziane N. Principe de biologie moléculaire en biologie moléculaire, campus référence. édition elsevier masson 2005.
76. Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol.* 2006 Oct;92(5):1081-7.
77. Peltier C, Futura-Sciences. site internet : <http://www.futura-sciences.com>. 2011.
78. NCBI. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). site internet : <http://ncbinlmnihgov/blastcgi>.
79. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta.* 2006 Jan;363(1-2):83-94.
80. Stensvold CR, Traub RJ, von Samson-Himmelstjerna G, Jespersgaard C, Nielsen HV, Thompson RC. *Blastocystis*: subtyping isolates using pyrosequencing technology. *Exp Parasitol.* 2007 Jun;116(2):111-9.
81. Zierdt CH, Zierdt WS, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *J Parasitol.* 1995 Feb;81(1):127-9.
82. Kaneda Y, Horiki N, Cheng X, Tachibana H, Tsutsumi Y. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai J Exp Clin Med.* 2000 Jun;25(2):51-6.

83. Hussain R, Jaferi W, Zuberi S, Baqai R, Abrar N, Ahmed A, Zaman V. Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Mar;56(3):301-6.
84. Santos HJ, Rivera WL. Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis hominis* in sera and intestinal secretions of orally infected mice. *Parasitol Res.* 2009 Oct;105(5):1303-10.
85. Abou Gamra MM, Elwakil HS, El Deeb HK, Khalifa KE, Abd Elhafiz HE. The potential use of 29 kDa protein as a marker of pathogenicity and diagnosis of symptomatic infections with *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 2011 May;108(5):1139-46.
86. Hegazy MM, Maklouf LM, El Hamshary EM, Dawoud HA, Eida AM. Protein profile and morphometry of cultured human *Blastocystis hominis* from children with gastroenteritis and healthy ones. *J Egypt Soc Parasitol.* 2008 Aug;38(2):453-64.
87. Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, Mir A, Borrás R. Soluble-protein and antigenic heterogeneity in axenic *Blastocystis hominis* isolates: pathogenic implications. *Parasitol Res.* 1999 Feb;85(2):93-7.
88. Tan KS, Ibrahim M, Ng GC, Nasirudeen AM, Ho LC, Yap EH, Singh M. Exposure of *Blastocystis* species to a cytotoxic monoclonal antibody. *Parasitol Res.* 2001 Jul;87(7):534-8.
89. Martínez V, Caumes E. Metronidazole. *Ann Dermatol Venereol.* 2001 Sep;128(8-9):903-9.
90. Dinleyici EC, Eren M, Dogan N, Reyhanioglu S, Yargic ZA, Vandenas Y. Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* or metronidazole in symptomatic children with *Blastocystis hominis* infection. *Parasitol Res.* 2010 Mar;108(3):541-5.
91. Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitol Res.* 2005 Jun;96(4):273-5.
92. Hareesh K, Suresh K, Khairul Anus A, Saminathan S. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Trop Med Int Health.* 1999 Apr;4(4):274-7.
93. Mirza H, Teo JD, Upcroft J, Tan KS. A rapid, high-throughput viability assay for *Blastocystis spp.* reveals metronidazole resistance and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb;55(2):637-48.
94. Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, Palermo F, Cacopardo B. A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. *J Travel Med.* 2003 Mar-Apr;10(2):128-30.
95. Ok UZ, Girginkardesler N, Balcioglu C, Ertan P, Pirildar T, Kilimcioglu AA. Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *Am J Gastroenterol.* 1999 Nov;94(11):3245-7.
96. Rossignol JF, Kabil SM, Said M, Samir H, Younis AM. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005 Oct;3(10):987-91.
97. Dogruman-AI F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitol Res.* 2009 Dec;106(1):263-8.
98. Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol.* 1991 Apr;29(4):676-9.
99. Santin M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol.* 2004 Jun 21;122(2):103-17.
100. Meloni D, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, Chabe M, Delhaes L, Dei-Cas E, Delbac F, Luigi Fiori P, Di Cave D, Viscogliosi E. Molecular subtyping of *Blastocystis sp.* isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res.* 2011 Feb 22.
101. Menounos PG, Spanakos G, Tegos N, Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. Direct detection of *Blastocystis sp.* in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Mol Cell Probes.* 2008 Feb;22(1):24-9.
102. Kirchgesser M. The new MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kits- Fast and flexible Fully Automated Sample Preparation. *Biochemica.* 2003(4).

103. Bohm-Gloning B, Knobloch J, Walderich B. Five subgroups of *Blastocystis hominis* from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. Trop Med Int Health. 1997 Aug;2(8):771-8.
104. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of blastocystis. Protist. 2006 Feb;157(1):77-85.
105. NCBI. Basic Local Alignment Search Tool BLAST. site internet : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
106. Noel C, Peyronnet C, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Sogin ML, Sogin ML, Capron M, Viscogliosi E, Zenner L. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. Mol Biochem Parasitol. 2003 Jan;126(1):119-23.
107. Whipps CM, Boorom K, Bermudez LE, Kent ML. Molecular characterization of *Blastocystis* species in Oregon identifies multiple subtypes. Parasitol Res. 2010 Mar;106(4):827-32.
108. Saitou N, Omoto K. Time and place of human origins from mt DNA data. Nature. 1987 May 28-Jun 3;327(6120):288.
109. Lantz P, Matsson M, Wadström T. Removal of PCR inhibitors from human faecal smples through the use of anaqueous two-phase system for sample preparation proir to PCR. Journal of Microbiological Methods. 1997(28):159-67.
110. Jones MS, 2nd, Ganac RD, Hiser G, Hudson NR, Le A, Whipps CM. Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. Parasitol Res. 2008 Aug;103(3):551-7.
111. Yoshikawa H, Dogruman-Ai F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. Parasitol Res. 2011 Apr 16.
112. Gonzalez-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. Parasitol Res. 2010 Jan;108(1):87-93.
113. Graczyk TK, Shiff CK, Tamang L, Munsaka F, Beitin AM, Moss WJ. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. Parasitol Res. 2005 Dec;98(1):38-43.
114. Lu CT, Sung YJ. Epidemiology of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites among the immigrant population in northeastern Taiwan by routine physical examination for residence approval. J Microbiol Immunol Infect. 2009 Dec;42(6):505-9.
115. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1990 Jan;28(1):116-21.

# TABLE DES MATIERES

|   |    |
|---|----|
| REMERCIEMENTS .....   | 6  |
| SOMMAIRE .....  | 10 |
| TABLE DES ABREVIATIONS .....  | 13 |
| INTRODUCTION .....  | 14 |
| PREMIERE PARTIE : GENERALITES .....   | 15 |
| 1. CLASSIFICATION .....   | 15 |
| 1.1 Taxonomie .....   | 15 |
| 1.2 Terminologie .....  | 16 |
| 1.3 Nomenclature.....   | 17 |
| 2. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES.....  | 19 |
| 2.1 Culture <i>in vitro</i> .....   | 19 |
| 2.2 Morphologie .....   | 20 |
| 2.2.1 La forme vacuolaire (FV) ou forme à vacuole centrale (6).....   | 20 |
| 2.2.1.1 La vacuole.....   | 21 |
| 2.2.1.2 Le cytoplasme .....   | 21 |
| 2.2.1.3 Le manteau de surface .....   | 22 |
| 2.2.2 La forme granulaire .....   | 23 |
| 2.2.3 La forme amiboïde .....   | 24 |
| 2.2.4 la forme kystique .....   | 25 |
| 2.2.5 Autres formes.....  | 26 |
| 2.3 Cycle parasitaire hypothétique et mode de reproduction.....   | 26 |
| 2.3.1 Cycle hypothétique faisant intervenir quatre modes de reproduction<br>asexuée (1973).....                   | 27 |
| 2.3.2 Cycle hypothétique basé sur un cycle externe et un cycle d'auto-<br>infection (32).....                     | 28 |
| 2.3.3 Cycle hypothétique de Stenzel et Boreham basé sur les formes<br>avacuolaires et multivacuolaires (23) ..... | 29 |
| 2.3.4 Cycle hypothétique reprenant des études récentes : proposition d'un<br>nouveau cycle.....                   | 29 |
| 3. EPIDEMIOLOGIE.....   | 32 |
| 3.1 Répartition géographique du parasite.....   | 32 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 3.2       | Répartition géographique des différents sous-types.....                              | 32 |
| 3.3       | Hôte et réservoir du parasite.....   | 34 |
| 3.4       | Mode de transmission.....  | 34 |
| 3.5       | Facteurs de risques.....   | 35 |
| 3.5.1     | Les migrants et voyageurs.....   | 35 |
| 3.5.2     | Variation saisonnière (14).....  | 35 |
| 3.5.3     | Contacts avec les animaux.....   | 35 |
| 3.5.4     | Cancer et immunodépression.....  | 35 |
| 3.5.5     | L'âge.....   | 35 |
| 3.5.6     | Pathologie psychiatrique.....  | 36 |
| 4.        | PATHOGENICITE.....   | 36 |
| 4.1       | Troubles digestifs.....  | 36 |
| 4.2       | Manifestations allergiques.....  | 37 |
| 4.3       | Virulence des sous-types.....  | 38 |
| 4.3.1     | Troubles digestifs.....  | 39 |
| 4.3.2     | Manifestations allergiques.....  | 39 |
| 4.4       | <i>Blastocystis</i> spp. : pathogène ou pas ?.....                                   | 40 |
| 5.        | PHYSIOPATHOLOGIE.....  | 40 |
| 6.        | DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....   | 43 |
| 6.1       | Diagnostic direct.....   | 43 |
| 6.1.1     | L'EPS (68).....  | 43 |
| 6.1.1.1   | Principe.....  | 44 |
| 6.1.1.2   | <i>Blastocystis</i> spp. et EPS.....   | 45 |
| 6.1.2     | La culture <i>in vitro</i> .....   | 46 |
| 6.1.3     | Détection de l'ADN génomique de <i>Blastocystis</i> spp.....                         | 46 |
| 6.1.3.1   | Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP).....                   | 47 |
| 6.1.3.2   | La PCR conventionnelle.....  | 47 |
| 6.1.3.2.1 | Principe.....  | 47 |
| 6.1.3.2.2 | Application de la PCR conventionnelle à la recherche de <i>Blastocystis</i> spp..... | 49 |
| 6.1.3.3   | La PCR nichée (75).....  | 49 |
| 6.1.3.4   | Le séquençage.....   | 49 |
| 6.1.3.4.1 | Méthode manuelle.....  | 49 |
| 6.1.3.4.2 | Méthodes automatisées.....   | 50 |
| 6.1.3.5   | Le clonage.....  | 52 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 6.1.3.6                                     | La PCR en temps réel.....                                 | 52 |
| 6.1.3.6.1                                   | Principe .....  | 52 |
| 6.1.3.6.2                                   | PCR en temps réel et <i>Blastocystis</i> spp.....         | 53 |
| 6.2   | Diagnostic indirect.....                                  | 54 |
| 7.  | TRAITEMENT .....  | 56 |
| 7.1   | Le métronidazole FLAGYL® .....                            | 56 |
| 7.2   | Le cotrimoxazole BACTRIM® .....                           | 58 |
| 7.3   | Le nitazoxanide .....                                     | 58 |
| 7.4   | la paromomycine HUMATIN® .....                            | 58 |
| 7.5   | ULTRALEVURE® .....  | 58 |
| 7.6   | Autres molécules .....                                    | 59 |
| 8.  | OBJECTIFS DE L'ETUDE .....                                | 59 |
| DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE ..... |   | 60 |
| 1.  | RECRUTEMENT DES PATIENTS.....                             | 60 |
| 2.  | LA PREPARATION DES ECHANTILLONS DE SELLES .....           | 60 |
| 2.1   | Méthode au chlorure de Césium (41, 99) .....              | 61 |
| 2.1.1                                       | Principe .....  | 61 |
| 2.1.2                                       | Mode opératoire .....                                     | 61 |
| 2.1.3                                       | Avantages et inconvénients .....                          | 62 |
| 2.2   | Méthode avec tampon PBS sur culot de centrifugation ..... | 62 |
| 2.2.1                                       | Principe .....  | 62 |
| 2.2.2                                       | Mode opératoire .....                                     | 62 |
| 2.2.3                                       | Avantages et inconvénients .....                          | 62 |
| 2.3   | Méthode avec tampon PBS sur surnageant .....              | 63 |
| 2.3.1                                       | Principe .....  | 63 |
| 2.3.2                                       | Mode opératoire .....                                     | 63 |
| 2.3.3                                       | Avantages et inconvénients .....                          | 63 |
| 3.  | EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE.....                        | 64 |
| 3.1   | Extraction manuelle .....                                 | 64 |
| 3.1.1                                       | Technique de référence .....                              | 64 |
| 3.1.2                                       | Kits commerciaux.....                                     | 64 |
| 3.2   | Extraction automatique .....                              | 65 |
| 4.  | LA PCR.....   | 66 |
| 4.1   | choix des amorces (17, 76, 103, 104).....                 | 66 |
| 4.2   | La préparation du mix .....                               | 67 |



|  |   |    |
|--|---|----|
| 4.2.1  | Choix de l'enzyme : ADN polymérase.....   | 67 |
| 4.2.2  | Les autres composés .....   | 67 |
| 4.2.3  | Déroulement de la PCR .....   | 68 |
| 4.2.4  | Vérification du résultat de la PCR .....  | 68 |
| 4.2.5  | Purification des produits de PCR en vue d'effectuer un génotypage                                 | 69 |
| 5.   | LE SEQUENÇAGE .....   | 70 |
| 5.1  | Mode opératoire .....   | 70 |
| 5.2  | Purification des séquences .....  | 71 |
| 5.3  | Détermination de la séquence d'ADN .....  | 71 |
| 5.4  | Analyse des séquences et arbre phylogénique .....   | 71 |
| TROISIEME PARTIE : OPTIMISATION DE LA METHODE EMPLOYEE ET<br>PERSPECTIVES D'EVOLUTION .....  |   | 73 |
| 1.   | OPTIMISATION DE LA PCR.....   | 73 |
| 1.1  | Première étape: détermination de la concentration optimale en MgCl <sub>2</sub> ..                | 73 |
| 1.2  | Deuxième étape: temps de dénaturation et d'hybridation.....                                       | 74 |
| 1.3  | Deuxième étape : température d'hybridation .....  | 75 |
| 1.4  | Troisième étape : échantillons à faible signal .....  | 76 |
| 1.5  | Quatrième étape: diminution des inhibiteurs de PCR .....  | 76 |
| 1.5.1  | Mise en place d'une gamme de dilutions pour tester l'ADN à des<br>concentrations différentes..... | 77 |
| 1.5.2  | Chauffage de l'échantillon avant extraction .....   | 77 |
| 2.   | SENSIBILITE DE NOTRE TECHNIQUE COMPAREE AUX AUTRES METHODES .....                                 | 78 |
| 2.1  | Préparation de l'échantillon avant extraction .....   | 78 |
| 2.2  | Culture avant extraction .....  | 78 |
| 2.3  | Extraction automatique et extraction manuelle .....   | 79 |
| 2.4  | PCR conventionnelle et coinfections .....   | 79 |
| 3.   | PERSPECTIVES D'AVENIR.....  | 80 |
| QUATRIEME PARTIE : ETUDE PROSPECTIVE AU C.H.U DE BORDEAUX ;<br>RESULTATS ET DISCUSSION ..... |   | 81 |
| 1.   | PREVALENCE DES PARASITES RETROUVES A L'EPS .....  | 81 |
| 2.   | COINFECTIONS DU <i>BLASTOCYSTIS</i> SPP. AVEC D'AUTRES PARASITES INTESTINAUX...                   | 83 |
| 3.   | ANALYSE EPIDEMIOLOGIQUE .....   | 84 |
| 3.1  | Prévalence du <i>Blastocystis</i> spp. ....   | 84 |
| 3.2  | Répartition en fonction des services hospitaliers .....   | 84 |
| 3.3  | <i>Blastocystis</i> spp. et immunodépression .....  | 85 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4 Répartition homme / femme.....                                     | 86  |
| 3.5 Répartition en fonction de l'âge .....                             | 86  |
| 3.6 Habitation rurale / urbaine et contact avec les animaux .....      | 87  |
| 3.7 Répartition selon les sous-types .....                             | 87  |
| 3.7.1 Comparaison des résultats aux données de la littérature.....     | 87  |
| 3.7.2 Réalisation d'un arbre phylogénique.....                         | 90  |
| 3.8 Voyages récents .....  | 92  |
| 4. APPROCHE CLINICO-BIOLOGIQUE .....                                   | 93  |
| 4.1 Aspect des selles .....  | 93  |
| 4.2 Syndrome inflammatoire et fièvre .....                             | 93  |
| 4.3 Signes digestifs .....   | 94  |
| 4.4 Densité parasitaire et symptomatologie digestive.....              | 96  |
| 4.5 Signes cutanés .....   | 96  |
| 4.6 Traitement.....  | 97  |
| 5. SYNTHÈSE DE L'ÉTUDE.....  | 98  |
| 6. CONDUITE A TENIR DEVANT LA PRÉSENCE DE <i>BLASTOCYSTIS</i> SPP..... | 99  |
| CONCLUSION .....   | 101 |
| ANNEXE 1 .....   | 102 |
| ANNEXE 2 .....   | 103 |
| ANNEXE 3 .....   | 104 |
| ANNEXE 3 BIS .....   | 105 |
| ANNEXE 4 .....   | 106 |
| ANNEXE 5 .....   | 107 |
| BIBLIOGRAPHIE.....   | 108 |
| TABLE DES MATIÈRES .....   | 114 |



## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



#### RESUME en français

Décrit depuis le début du XXème siècle, *Blastocystis* spp. est un parasite ubiquitaire vivant dans le tube digestif de son hôte et retrouvé dans les selles humaines et animales. Il fait partie des parasites intestinaux les plus fréquemment retrouvés à l'examen parasitologique des selles (EPS). Rattaché au groupe des Straménophiles, *Blastocystis* spp. possède une grande diversité génétique puisque neuf sous-types différents sont retrouvés chez l'homme. Il serait responsable d'une symptomatologie digestive et de manifestations cutanées. Nous avons développé une technique de PCR conventionnelle et le génotypage pour identifier ces différents sous-types. La sensibilité de notre technique est de 89%. Une étude prospective de sept mois a été réalisée au CHU de Bordeaux afin d'identifier les souches circulantes chez les patients porteurs de *Blastocystis* spp. et d'étudier les versants épidémiologique et clinico-biologique. La prévalence de *Blastocystis* spp. est de 5,2%. Il est retrouvé aussi bien chez les patients présentant des troubles digestifs que n'en présentant pas. Certains patients présentant des troubles digestifs ou des manifestations allergiques ne possédaient pas d'autre étiologie à leurs troubles ; c'est pourquoi *Blastocystis* spp. peut être à l'origine de ces symptomatologies. ST3 est retrouvé en majorité (38%), puis ST1 et ST4 (22% chacun), ST2 (12%) et enfin ST6 (6%). Il n'a pas été trouvé de relation entre le sous-type et la symptomatologie. Un arbre décisionnel a été réalisé pour indiquer la conduite à tenir en cas d'EPS positif à *Blastocystis* spp. Un traitement est mis en place en cas de symptômes sans autre étiologie par métronidazole FLAGYL®.

#### TITRE en anglais

Development of a conventional PCR technique for the genotype of *Blastocystis* spp. in stool : epidemiological and bioclinical tracks of a study done in the hospital of Bordeaux

#### RESUME en anglais

Described since the beginning of the XXth century, *Blastocystis* spp. is a ubiquitous parasite living in the digestive tract and found in human and animal stools. It is part of the most frequently found intestinal parasites during parasite exams. Belonging to the stramenophiles branch, *Blastocystis* spp. is characterized by a great genetical diversity made up of 9 different subcategories found in man. It is supposed to be responsible for digestive symptomatology and skin disorder. Its parasite cycle, its pathogenicity and physiopathology are not yet fully explored. We have developed a conventional PCR technique and the genotype to identify these different subcategories. The sensitivity of our technique is that of 89%. A 7 month study has been done in the hospital of Bordeaux in order to identify the circulating strains by patients carrying *Blastocystis* spp and to study the epidemiological and bioclinical tracks. The prevalence of *Blastocystis* spp. Is 5.2%. It is found by patients with digestive troubles as well as patients without. Some of them presenting digestive troubles or allergical manifestations did not present any other etiology to their troubles, that is why *Blastocystis* spp. might be the cause of symptomatology. ST3 is the most common found element (38%), then come ST1 and ST4 (22% each), ST2 (12%) and finally ST6 (6%). There was no link found between the subcategory and the symptomatology.

#### MOTS-CLES

*Blastocystis* spp., PCR conventionnelle, séquençage, prevalence, examen parasitologique des selles,

Mémoire de DES de biologie Médicale tenant lieu de Thèse pour l'obtention du diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Laboratoire de parasitologie-mycologie, hôpital Saint-André, 33000 Bordeaux, France