



HAL
open science

Helminthiases digestives en Guyane française : évaluation et applications d'une qPCR multiplex en temps réel

Elsa Thery-Casari

► **To cite this version:**

Elsa Thery-Casari. Helminthiases digestives en Guyane française : évaluation et applications d'une qPCR multiplex en temps réel. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02438939

HAL Id: dumas-02438939

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02438939>

Submitted on 14 Jan 2020

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

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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 13 décembre 2019

Par Mme THERY-CASARI Elsa
Né(e) le 29/04/1992

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

**TITRE : Helminthiases digestives en Guyane
française : évaluation et applications d'une PCR
multiplex en temps réel**

----oOo----

JURY : Président : Pr Philippe COLSON – PU-PH (IHU Méditerranée Infection)

Membres : Pr Magalie PIERRE DEMAR (Directeur de Thèse) – PU-PH (CH de
Cayenne)

Pr Stéphane RANQUE - PU-PH (IHU Méditerranée Infection)

Dr Sékéné BADIAGA – PH (Hôpital Nord)

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Philippe COLSON,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à mon travail et vous assure ma profonde reconnaissance.

À Madame le Professeur Magalie PIERRE DEMAR,

Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse. Je te remercie de la confiance que tu m'as accordée en me confiant ce travail et en me laissant organiser cette mission à Trois-Palétuviers. Cette année en Guyane au sein de l'équipe du LHUPM m'a beaucoup appris, humainement et professionnellement. Ta détermination et ta rigueur m'inspire, sois assurée de mon profond respect et de mon entière reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Stéphane RANQUE,

Merci de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir initiée à la Parasitologie lors de mon passage au CHU de la Timone. Je tiens à vous assurer ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

À Monsieur le Docteur Sékéné BADIAGA,

Merci de participer à mon jury de thèse et pour l'honneur que vous me faites en jugeant mon travail.

Merci à toute l'équipe de **PALUSTOP**, de m'avoir intégré au projet, de m'avoir permis de réaliser cette étude, pour votre bonne humeur et votre implication.

Un grand merci à **Emilie MOSNIER**, tu m'as énormément apportée lors de nos discussions, de nos missions, ta connaissance de la Guyane m'a été d'une aide précieuse dans la compréhension de ses problématiques. La Guyane a de la chance de t'avoir, j'espère que nous retravaillerons ensemble.

À mes coéquipières de terrain, **Estelle et Mathilde** pour leur soutien, leur optimisme et leur motivation, rien n'aurait été possible sans votre aide précieuse.

À toute l'équipe de Parasitologie de Cayenne qui ne sera pas là pour cette soutenance, à **Denis** pour sa bonne humeur, à **Meggie** pour ton apprentissage et tes conseils, à **Romain** pour son avis sur la question, quelle que soit la question, à **Max** pour sa fascinante minutie et tous ceux qui m'ont accompagné pendant un an.

À ma famille,

À mes parents,

Merci pour votre soutien dans tous mes projets alors même que ceux-ci me guident souvent vers d'autres continents. Merci de m'avoir encouragée toutes ces années, grâce à vous j'ai pu réaliser ces belles études et les finaliser aujourd'hui. Je vous serai éternellement reconnaissante de votre soutien et votre amour.

À Martha et Christian, je vous remercie de prendre soin de mes parents et de leur offrir chaque jour un petit peu plus de bonheur par votre présence.

À Claire et Clémence, mes deux grandes mousquetaires qui m'ont appris le sens du partage lors de nos séances de comptage de ravioli et qui, grâce à leurs conseils et leur soutien m'ont permis de devenir celle que je suis. **À Claire,** ton sens affûté de l'esthétisme, artiste pleine d'humilité, je te remercie de m'avoir inspirée depuis toute petite et de continuer à m'accompagner. **À Clémence,** merci pour ta bienveillance et ton altruisme, ton soutien sans faille m'a permis de parcourir beaucoup de chemin, tu vas me manquer ces prochaines années, j'ai hâte de découvrir un peu de Nouvelle-Calédonie à tes côtés.

À Grand-mère, même si tu ne peux être là je te remercie pour tous ces bons moments.

À Marion, merci de tes encouragements, de ta confiance et de l'attention que tu portes à tes nièces.

À mes amis,

À mes petits gars de Monet :

À **Paul** За вашу непоколебимую страсть к футболу. Ты останешься моим маленьким другом, куда бы ты ни пошел, à **Nico** pour sa détermination d'Hwoarang m'apprenant que tout est possible si tu manges beaucoup, beaucoup de fromage blanc. À **Hugo**, qui m'apprend qu'on peut chaque jour vivre avec ses contradictions (file ton insta). À **Gab**, qui même par son absence reste absent. À **Natan**, pour son oreille attentive et son avant-gardisme, la trottinette, c'était toi !

À ma ptite **Girafe**, partenaire de classe, d'orchestre et de tous les jours, ces souvenirs restent gravés dans ma mémoire, merci de ton soutien et de ton amitié.

Aux amis marseillais avec qui j'ai pu faire les quatre-cent-un coups ces deux premières années d'internat : **Léo**-les-babines qui prouve haut la main qu'une vie sans sport est possible, **Nono**-le-chérubin dont les os ne peuvent soutenir tant de grâce angélique, **Jibé**-lamainverte prouvant que médecine et trashcore, c'est possible. **Yanni**-(s), **Vincent**-mètre-onvoitoujoursseyeux et **Hug-o**-grandsdoigts, merci de m'accueillir sur ce canapé, la chaleur de ce logis me rappelle la douceur des premières années. **Astrid**, merci pour ta présence, que ce soit en Guyane, en Guadeloupe ou à Marseille.

Aux amis Guyanais du premier semestre qui ont rendu cette année encore plus belle qu'espéré : **Antoine** -merci pour ton éthique-, **Lucas**, **Davy**, **Alexandra**, **Yann**, **Jerem**, **Pierre Daniel**, **Val**,... et tous les autres Accras ! J'ai aimé partager cette expérience à vos côtés, d'Est en Ouest, nos folles péripéties en Guyane n'ont fait que renforcer la dimension surréaliste et intemporelle de ce semestre.

Aux Saint-Laurentais, plus particulièrement mes colocs de Montravel : **Moise** et sa liberté, **Hugues** et son avis éclairé, **Man-net** pour leur bonne humeur et **Alex** dont la générosité a permis à nos poules toxoplasmiques de dormir chaque nuit. Aux poules, parties sans crier gare.

À la team café du labo (semestre II), les litres de café déglutis ne sont plus à compter, la fortune de l'épicerie d'en face n'est plus à faire et les fous rires ne peuvent tous être remémorés. A **Mathilde, Paul, Estelle, Félix et Céphyse** pour ces moments de réflexion et d'introspection sur la thèse et ses effets collatéraux.

Aux Guadeloupéens qui m'ont soutenue pendant l'écriture de cette thèse : **Popo, Julia, Sarah**, merci d'avoir fait partie de mon quotidien.

À la coloc Saint-Justoise, pour votre soutien des derniers mois, pour votre adaptation quotidienne à mon désir de propreté parfois excessif. A **Pierre**, son groove et ses boccas, je te remercie de ton écoute patiente et constructive, deeper à tes côtés m'a été d'une grande aide. A **Jaume** pour son soutien goudalien, ta douce odeur d'ail me manquera pendant ton absence, reviens-nous vite ! A **Laura** et son ptit cou fragile, j'espère que le Mexique t'as remis la patate ! A **Hannah** et ses 'foms', hâte de retrouver le cerceau perdu depuis déjà trop longtemps ! A **Péhème**, son chat et son bolide chromé.

À mon plus grand soutien pendant cette thèse : **Moushka**, ces heures passées à tes côtés m'ont donné la force de continuer, merci pour tes gloussements qui réchauffent le cœur, j'espère que tu resteras toujours aussi bonne pâte.

Aux incroyables rencontres que j'ai pu faire à Marseille, en Guyane ou en Guadeloupe. **A tous ceux que je n'ai pas cités** dans un souci de respect de mise en page. J'espère que ce travail vous donnera envie de découvrir la Guyane.

À **Alexandre Vié**, du Maroni au Roraïma, de Gosier à Pointe-à-pitre, de Saint-Just à Castellane, je te remercie de nous avoir permis d'écrire cette histoire qui ne pouvait qu'être rêvée si elle n'avait pas réellement existé. Merci de croire en nous, j'espère pouvoir encore longtemps gravir tous ces sommets à tes côtés.

La tradition voudrait que je te remercie en dernier mais tu n'as rien de commun, c'est d'ailleurs pour cela que je t'ai choisi.

Je finirai donc ces remerciements en dédiant cette thèse à **Touloulou**, petit diable parti trop tôt.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Table des matières

Introduction	21
PARTIE A : GÉNÉRALITES ET REVUE GÉNÉRALE SUR LES PARASITOSEs INTES TINALES.....	23
I. Les Némat helminthes intestinaux : un problème de santé publique dans le monde et en Guyane française.....	23
I.1. Épidémiologie des Némat helminthes	23
I.1.1. Répartition, prévalence et conséquences dans le monde.....	23
I.1.2. Épidémiologie des Helminthiases les plus fréquentes en Guyane française : revue de la littérature	26
I.1.3. Stratégies de lutte de l'OMS	34
I.1.4. Traitement médicamenteux.....	36
I.2. Caractéristiques des principaux némat helminthes.....	37
I.2.1. Classification.....	37
I.2.2. Ecologie, transmission et mode de contamination	38
I.2.2.1 Ankylostomes: Necator americanus et Ancylostoma duodenale	38
I.2.2.2 Strongyloides stercoralis	39
I.2.2.3 Ascaris lumbricoides	41
I.2.3. Synthèses épidémiolo-gique et parasitologique des 4 principaux helminthes	42
II. Diagnostic biologique standard des helminthiases intestinales.....	44
II.1. Le diagnostic microscopique	44
II.1.1. Examen macroscopique	44
II.1.2. Examen microscopique des selles.....	45
II.1.2.1 Examen direct ou état frais	45
II.1.2.2 Techniques de concentration.....	45
II.1.3. Techniques spécifiques à Strongyloides stercoralis.....	49
II.2. Diagnostic sérologique	51
III. Nouvelles approches diagnostiques	53
III.1. La biologie moléculaire : principe de la PCR (polymérase Chain Reaction).....	53
III.2. La PCR en temps réel ou qPCR	55
III.2.1. Le principe technique et les différentes approches.....	55
III.2.2. Expression des résultats de PCR en temps réel	57
III.2.3. Validation des performances de l'amplification.....	58

III.3. PCR temps réel appliquée aux helminthes.....	59
III.3.1 Prérequis à l'utilisation de la qPCR helminthes	59
III.3.2. Intérêt de la qPCR multiplex	59
PARTIE B : MISE EN PLACE ET EVALUATION	
D'UNE PCR MULTIPLEX EN TEMPS REEL	
DES PRINCIPALES HELMINTHIASES EN GUYANE FRANÇAISE	61
I. Introduction et objectifs de l'étude	61
II. Mise en place de la qPCR multiplexe à visée du diagnostic des helminthiases	63
II.1. Choix de la méthode qPCR	63
II.2. Technique d'extraction	63
II.3. Amplification d'ADN par qPCR	66
III. Comparaison des méthodes qPCR versus microscopie optique : témoins, échantillons et échantillonnage	70
III.1. Techniques classiques microscopiques de parasitologie des selles ..	70
III.2. Echantillons et échantillonnage	70
III.2.1. Collecte des échantillons pour étude de corrélation	70
III.2.1.1 Echantillonnage avec congélation à J0 de l'analyse microscopique	71
III.2.1.2. Échantillonnage avec différents temps de congélation.....	72
III.2.2 Production de témoins positifs	72
IV. Résultats de l'analyse de corrélation entre les deux techniques	73
PARTIE C : APPLICATIONS D'UNE PCR MULTIPLEX EN TEMPS	
REEL DES PRINCIPALES HELMINTHIASES EN GUYANE	
FRANÇAISE	78
I. Application de l'usage de la qPCR dans le cadre de l'étude HELMINFAG	78
I.1. Objectif de l'étude HELMINFAG	78
I.2. Matériel et méthodes	79
I.3. Résultats de la qPCR dans la cadre d'HELMINFAG	79
II. Application dans le cadre de l'étude de Trois-Palétuviers.....	81
II.1. Contexte de l'étude PALUSTOP	81
II.2. Matériel et méthodes	83
II.3. Résultats.....	85
Discussion et perspectives.....	98

LISTE DES TABLEAUX

	Titre	Page
<u>Tableau 1</u> :	Estimation de la morbidité et de la mortalité imputables aux géohelminthiases transmises par le sol dans le monde.	27
<u>Tableau 2</u> :	Répartition des helminthiases selon l'âge et la zone géographique d'habitation selon les données collectées entre 2011 et 2016 au CHAR et au CHOG	34
<u>Tableau 3</u> :	Caractéristiques parasitologiques selon ANOFEL	44
<u>Tableau 4</u> :	Caractéristiques clinico-biologiques des Helminthes étudiés	41
<u>Tableau 5</u> :	Comparaison des deux méthodes d'extraction QIASymphony SP/AS (Qiagen®) et Power fecal DNA isolation Kil (Mobio®)	67
<u>Tableau 6</u> :	Sondes et amorces utilisées pour la qPCR multiplex helminthes	70
<u>Tableau 7</u> :	Programme d'amplification du Thermocycleur Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems.	71
<u>Tableau 8</u> :	Comparaison des résultats des techniques classiques de parasitologie de selles et de la qPCR multiplex échantillonnage de 46 selles de patients	77
<u>Tableau 9</u> :	nombre d'échantillons retrouvés positifs par parasite en technique microscopique et moléculaire sur les échantillons du laboratoire (n=46)	78
<u>Tableau 10</u> :	Valeurs des Ct sur des échantillons congelés à J0, J1, J2, J3 et J7	80
<u>Tableau 11</u> :	nombre d'échantillons retrouvés positifs pour <i>Necator americanus</i> en technique microscopique et moléculaire.	83
<u>Tableau 12</u> :	Résultats obtenus par les deux techniques (microscopie et qPCR) des échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).	90
<u>Tableau 13</u> :	Nombre d'échantillons retrouvés positifs par microscopie et par qPCR par parasite pour les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).	91
<u>Tableau 14</u> :	Liste non exhaustive des études comparatives de sensibilité entre microscopie et qPCR publiées dans la littérature.	106

LISTE DES FIGURES

	Titre	Page
<u>Figure 1</u> :	Prévalence par pays des <i>Ascaris lumbricoides</i> (A), <i>Trichuris trichiura</i> (B), Ankylostome (<i>Necator americanus</i> et <i>ancylostoma duodenale</i>) (C) et de <i>Strongyloides stercoralis</i> (D)	26
<u>Figure 2</u> :	Carte de la Guyane française	29
<u>Figure 3</u> :	Segmentation de la Guyane par région	30
<u>Figure 4</u> :	Synthèse et site des études portant sur les parasitoses intestinales en Guyane française	32
<u>Figure 5</u> :	Répartition des différents helminthes en Guyane française pour les échantillons de selles récoltés au CHAR et au CHOG entre 2011 et 2016	33
<u>Figure 6</u> :	Organigramme décisionnel de traitement selon l'OMS	37
<u>Figure 7</u> :	Schéma de la morphologie interne d'un nématode	39
<u>Figure 8</u> :	Cycle parasitaire de l'Ankylostome	40
<u>Figure 9</u> :	Cycle parasitaire de <i>Strongyloidesstercoralis</i>	41
<u>Figure 10</u> :	Cycle parasitaire de l' <i>Ascaris lumbricoides</i>	43
<u>Figure 11</u> :	(A) œufs d' <i>Ascaris lumbricoides</i> , (B) œufs d'ankylostome, (C) larve d'ankylostome, (D) larve de <i>Strongyloidesstercoralis</i>	50
<u>Figure 12</u> :	Schéma d'une méthode de Baermann	51
<u>Figure 13</u> :	Observation des sillons des larves de <i>Strongyloidesstercoralis</i> (A) et d'ancylostomidé (B) au microscope x100 selon la méthode d'ARAKAKI	52
<u>Figure 14</u> :	Schéma d'un cycle de PCR	56
<u>Figure 15</u> :	Principe des sondes Taqman	57
<u>Figure 16</u> :	Courbe sigmoïdale d'une réaction de PCR	59
<u>Figure 17</u> :	Droite standard établie à l'aide d'une gamme d'étalonnage	60
<u>Figure 18</u> :	Schéma du principe d'extraction d'ADN par le QIASymphony (QIAGEN®)	68

<u>Figure 19</u> :	Description de la corrélation de méthode sur les échantillons du laboratoire (n=46)	76
<u>Figure 20</u> :	Représentation graphique des résultats obtenus par microscopie et qPCR sur les échantillons collectés au laboratoire du CHAR (n=46)	79
<u>Figure 21</u> :	Description de la corrélation de méthode sur les échantillons de l'étude HELMINFAG (n=164).	80
<u>Figure 22</u> :	Localisation du village de Trois-Palétuviers	85
<u>Figure 23</u> :	Echantillons retenus pour la corrélation de méthodes chez les échantillons de Trois palétuviers.	89
<u>Figure 24</u> :	Représentation graphique du nombre d'échantillons retrouvés positifs par les deux techniques par parasite.	92
<u>Figure 25</u> :	Représentation graphique des résultats obtenus par microscopie et qPCR sur les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).	
<u>Figure 26</u> :	Représentation graphique du nombre de mono/bi/tri/parasitisme retrouvés par microscopie et qPCR dans les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).	94
<u>Figure 27</u> :	Répartition des cas de parasitoses intestinales dans le village de Trois-Palétuviers	95
<u>Figure 28</u> :	Répartition des cas de parasitoses intestinales en fonction de l'âge dans la population de Trois-Palétuviers	97
<u>Figure 29</u> :	Répartition géographique globale des patients parasités dans le village de Trois-Palétuviers	98
<u>Figure 30</u> :	Répartition géographique des patients parasités par <i>Necator americanus</i> ou <i>Ancylostoma duodenale</i> dans le village de Trois-Palétuviers	99
<u>Figure 31</u> :	Répartition géographique des patients parasités par <i>Giardia intestinalis</i> dans le village de Trois-Palétuviers.	99
<u>Figure 32</u> :	Répartition géographique des patients parasités par <i>Ascaris lumbricoides</i> dans le village de Trois-Palétuviers.	100
<u>Figure 33</u> :	Répartition géographique des patients parasités par <i>Hymenolepis Nana</i> dans le village de Trois-Palétuviers.	100

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomique

ARNr : Acide DésoxiriboNucléique ribosomique

AUDEG : Agence d'Urbanisme et de Développement de la Guyane

CDPS : Centre délocalisé de Prévention et de Soins

CHAR : Centre Hospitalier André Rosemon

CHOG : Centre Hospitalier de l'Ouest Guyanais

ELISA :Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay

EPS : Examen Parasitologique des Selles

GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

IP : Indice Parasitaire

LIPS :LuciferaseImmunoprecipitationSystems

LHUPM : Laboratoire Hospitalo-Universitaire Parasitologie Mycologie

MIF :Merthiolate-Iode-Formol

MTN : Maladies Tropicales Négligées

OMS : Organisme mondial de la Santé

ONF : Office National des Forêts

PCR : Polymerase Chain Reaction

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

REI : Régiment étranger d'infanterie

RIMa : Régiment d'infanterie de Marine

STH : Helminthiases Transmises par le Sol

TDR : Test de Diagnostic Rapide

TROD : Test Rapide d'Orientation Diagnostic

Introduction

Les maladies parasitaires gastro-intestinales présentent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les helminthiases intestinales affectent à elles seules 1,5 milliards de personnes dans le monde (1), les géohelminthiases transmises par les sols (STH) étant classées parmi les maladies tropicales négligées. Bien que la mortalité liée à ces parasitoses soit faible et diminue dans le temps, leur morbidité reste considérable ; Effectivement, la morbidité des diarrhées chroniques d'origine parasitaire a des conséquences aussi bien clinico-biologiques (d'une simple diarrhée à une importante dénutrition pouvant provoquer un retard staturo-pondéral) qu'économiques (2,3). Cette morbidité semble particulièrement importante chez les enfants d'âge scolaire pour lesquels l'impact des diarrhées chroniques sur le développement a été démontré (4–6).

Ce problème de santé publique est notamment avéré en Guyane, département d'outre-mer français d'Amérique du sud, situé entre le Brésil et le Suriname. En effet, le climat tropical de ce département d'outre-mer ainsi que la précarité de sa population créent un environnement propice au développement des parasites (7) ; La lutte contre le péril fécal, l'accès à l'eau potable et l'abolition de tout autre facteur favorisant une contamination constituent dans ce département de 269 352 habitants recensés (INSEE 2016) un véritable enjeu de santé publique (1,8). Les données de la littérature dans ce département manquent, ne sont pas actualisées et portent principalement sur les populations amérindiennes (9,10).

Actuellement, au Centre Hospitalier Andrée Rosemon (CHAR) comme au Centre Hospitalier de l'Ouest Guyanais (CHOG), un diagnostic de ces parasitoses digestives est proposé grâce à l'examen microscopique des selles, seule méthode de référence. Cependant, cette technique manque de sensibilité, de spécificité (11–13). De nouvelles techniques plus performantes ont vu le jour telles que la technique Polymerase Chain Reaction (PCR) ; En effet, celle-ci permet de s'affranchir des erreurs dépendantes de l'opérateur-technicien, d'éviter la survenue de faux négatifs consécutive à une faible

concentration de parasites et permet en outre la différenciation des différentes espèces de parasites de façon certaine par la spécificité de ses amorces (13,14).

De plus, le diagnostic microscopique implique la lecture de selles fraîches au laboratoire. Or, l'isolement géographique et l'absence de microscope aux Centres Délocalisés de Santé et de Soins (CDPS) contraint à ce que les conditions optimales de diagnostic ne soient pas respectées, du fait d'un acheminement trop long des prélèvements par pirogue associé à la route ou l'avion, moyens d'accès aux zones reculées de Guyane.

L'objectif de cette étude est de mettre en place une PCR en temps réel (qPCR) multiplex qui détecte les 4 principales espèces de Némathelminthes les plus fréquentes en Guyane: *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale* et *Nector americanus* (15,16) afin de pallier les difficultés d'acheminement des échantillons provenant des CDPS.

Cet outil permettra d'améliorer la performance du diagnostic des parasitoses intestinales dans les conditions actuelles d'acheminement et, à terme, servira d'outil pour évaluer et suivre les prévalences des parasitoses intestinales en Guyane, ceci dans le cadre de la mise en place actuelle d'un plan d'éradication des parasites intestinaux dans ce département (17).

Dans ce travail, nous avons évalué cette qPCR en la comparant aux techniques classiques puis, lors d'une mission pilote réalisée en octobre 2018, nous avons estimé la prévalence des Helminthiases digestives dans un village amérindien de l'est de la Guyane sur le fleuve Oyapock, le village de Trois-Palétuviers.

PARTIE A : GÉNÉRALITES ET REVUE GÉNÉRALE SUR LES PARASITOSES INTESTINALES

I. Les Nématelminthes intestinaux : un problème de santé publique dans le monde et en Guyane française

I.1. Épidémiologie des Nématelminthes

I.1.1. Répartition, prévalence et conséquences dans le monde

En 2015, l’OMS estimait que plus d’un quart de la population mondiale était considérée à risque de développer une STH (1) et que la population à risque de contracter ce type d’helminthiase est estimée à 5 millions de personnes (8).

Les quatre STH les plus fréquemment diagnostiquées sont *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis* ainsi que les deux espèces d’ankylostomes *Ancylostoma duodenale* et *Necator americanus* (18).

Selon des données publiées respectivement en 2010 (19) et en 2011 (20), une disparité géographique et de prévalence est observée chez ces quatre principales espèces de Nématodes responsables de parasitoses intestinales comme représenté dans la figure 1 ci-dessous :

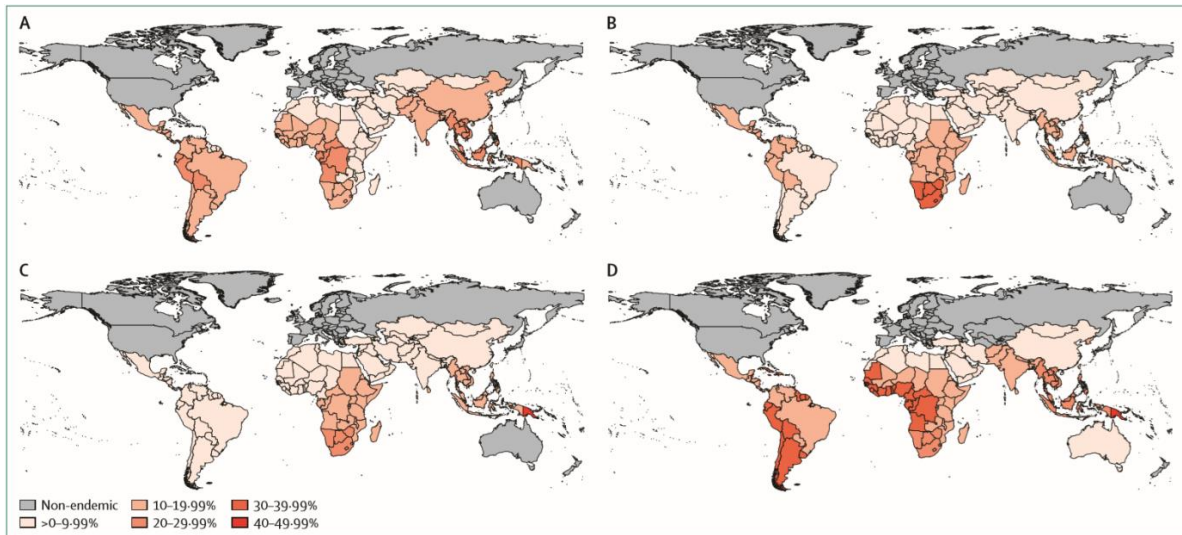


Figure 1 : Prévalence par pays des *Ascaris lumbricoides* (A), *Trichuris trichiura*(B), Ankylostome (*Necator americanus* et *ancylostoma duodenale*) (C) et de *Strongyloides stercoralis* (D) selon (18)

Ces Helminthiases ne peuvent se développer qu'à des conditions de température et d'humidité favorables, ce qui explique la répartition de ceux-ci dans les zones tropicales et subtropicales. En effet, les géohelminthiases touchent principalement l'Afrique subsaharienne, l'Amérique centrale et du sud et l'Asie orientale. De plus, on constate un lien étroit entre la situation socio-économique des pays touchés, pour la plupart qualifiés de pays émergents, et la prévalence de ces infections. Les facteurs favorisant ces contaminations sont en rapport avec l'accès à l'eau potable de la population, l'assainissement des eaux usées, l'hygiène des mains limitant le péril fécal ainsi que la marche pieds nus (1,21,22).

Ces STH sont considérées comme des maladies tropicales négligées (MTN) car elles causent un handicap et une souffrance énormes, mais peuvent être contrôlées ou éliminées (23) (voir chapitre A.I.1.3« Stratégie de lutte OMS »).

L'OMS fait état de la nécessité d'un traitement chimio-préventif pour 102 pays, soit une population estimée à 268,8 millions d'enfants d'âge préscolaires, 571,4 millions d'enfants d'âge scolaires et 250 millions de femmes en âge de procréer (24) ; la morbidité a tendance à s'accroître dans les pays à faibles revenus. On parle de

populations « vulnérables » (18). L'estimation du nombre de personnes atteintes à travers le monde ainsi que des indicateurs de morbi-mortalité sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Estimation de la morbidité et de la mortalité imputables aux géohelminthiases transmises par le sol dans le monde (18,24).

	Nombre de personnes atteintes (en millions)	Prévalence et intensité populations touchées	Mortalité (en milliers)
Ankylostomes : <i>Necator americanus</i> / <i>Ancylostoma duodenale</i>	472	Adultes > Enfants Intensité : Necator>Ancylostoma	3-65
Anguillulose : <i>Strongyloides stercoralis</i>	> 100	Manque d'information	
Ascariidiose : <i>Ascaris lumbricoïdes</i>	804	Enfants, adolescents > Adultes	3-60
Trichocéphalose : <i>Trichuris trichuira</i>	477	Enfants > Adultes	3-10

On notera une prévalence difficile à évaluer et probablement sous-estimée concernant *Strongyloides stercoralis* en raison d'une absence d'outils spécifiques tels que la technique de Baermann et la coproculture en boîte de Petri dans les études de grande ampleur réalisées (20,25).

L'ascaridiose et la trichocéphalose touchent principalement les enfants avec un pic de prévalence entre 5 et 15 ans en raison de la transmission féco-orale de ces deux parasites contrairement à l'ankylostomose qui atteint un pic de prévalence à l'âge adulte (5).

Il est décrit que les enfants en âge d'être scolarisés présentent une prévalence plus élevée ainsi qu'un plus haut risque d'infection par STH. Les infections par ces parasitoses sont considérées comme une cause de retard mental acquis (5,26,27), notamment lors de diarrhées récidivantes durant les deux premières années de vie (4).

Le retard staturo-pondéral par diminution de l'absorption de nutriments essentiels, l'anémie par carence martiale, la diminution de l'appétit sont imputables à ces parasites chez les enfants d'âge scolaire et ont été décrits largement dans la littérature (5,26). On observe d'ailleurs une reprise de la courbe de croissance lors de la prise de médicaments antiparasitaires (23,28).

Les STH contribuent à l'endiguement de la pauvreté dans ces populations du fait du retentissement sur le développement intellectuel et physique des enfants et de la réduction de productivité des adultes ainsi que leur capacité de travail (6). La perte de productivité associée au seul ankylostomose est évaluée à 139 milliards d'US dollars par an (2). Une étude rétrospective réalisée dans le sud des Etats-Unis grâce aux données de la commission Rockefeller a estimé la probabilité de fréquentation de la classe supérieure à 25 % pour les élèves ayant été traité contre l'ankylostomiase comparativement aux élèves non traités (29).

I.1.2. Épidémiologie des Helminthiases les plus fréquentes en Guyane française : revue de la littérature

Présentation du territoire d'étude : la Guyane française

La Guyane est une région administrative et un département français situé en Amérique du sud. Son territoire de 83 846 km² est recouvert à plus de 90% d'une forêt équatoriale dont l'humidité et la température favorisent le développement de nombreux parasites notamment dans les sols.

Ce département compte une population de 252 338 habitants, population qui ne cesse de croître par son taux de natalité plus élevé qu'en métropole (30).



Figure 2 : Carte de la Guyane française

La densité de population de la Guyane est inférieure à 3 habitants/km², une partie de sa population se trouvant en dehors des zones urbaines et péri-urbaines essentiellement sur le littoral telles que Cayenne, Saint-Laurent-du-Maroni et Kourou. Ces populations extra-urbaines estimées à 20 % de la population globale dépendent sur le plan des prises en charges médicales du CH de Cayenne par le biais des CDPS pour leurs soins.

Ces régions se trouvent désavantagées en ce qui concerne leur développement économique et sanitaire car elles se trouvent particulièrement isolées d'un point de vue géographique (voir annexe 1 : carte CDPS).

Selon l'INSEE, la Guyane présentait une croissance moyenne élevée de sa population à hauteur de 2,2 % par an entre 2008 et 2013, et d'autres organismes tels que l'AUDEG (Agence d'Urbanisme et de Développement de la Guyane) prédisent un fort accroissement de cette population d'ici 2030, soit une population prédite 4 fois supérieure sur le Maroni (31). Cela représente un réel défi dans la prise en charge de ces patients lors des prochaines années.

Afin de faciliter la compréhension des données épidémiologiques récoltées dans la littérature, nous séparerons la Guyane selon 5 régions : L'Ouest Guyanais, le littoral, l'agglomération du centre littoral, le centre et l'Est Guyanais (figure 3). Cette segmentation se trouve en accord avec les caractéristiques socio-culturelles, l'accès aux soins selon la localisation et les spécificités environnementales de ces zones (15).



Figure 3 : Segmentation de la Guyane par région (15)

La Guyane héberge différentes populations aux caractéristiques et habitudes de vie diverses ; les amérindiens, répartis principalement à l'est sur le fleuve Oyapoque mais aussi vivant dans la partie sud du Maroni constituent une communauté habitant de petits villages accessibles principalement par pirogue où la pêche, la chasse sont pratiquées principalement par les hommes (32).

De nombreux villages de l'intérieur n'ont pas accès à l'électricité ou à l'eau potable, étant situés à distance des bourgs équipés de groupes électrogènes (33). Ces conditions sanitaires ont toutefois été améliorées grâce à la mise à disposition de pompes à motricité humaine ou au développement de réseaux à bornes fontaines ou à la mise en place de cuves de récupération d'eau de pluie. Cependant, elles restent toujours insuffisantes pour assurer un maintien des conditions d'hygiène primaire.

Une autre problématique résulte de l'orpaillage illégal, phénomène préoccupant sur le plateau des Guyanes et la mise en place des programmes de contrôle et de réduction de cette pratique de l'orpaillage ne suffit pas à endiguer le phénomène, en témoigne la moitié de l'or exporté provenant de celui-ci (34). La multiplication et la précarité de ces camps illégaux affectent sensiblement les conditions d'hygiène des orpailleurs avec notamment une absence de latrines et la présence de matières fécales en amont des campements pouvant être emportées sur ces camps en cas de fortes pluies. Ces conditions amènent certains d'entre eux à avoir recours à des soins au CH de Cayenne où un polyparasitisme intestinal est souvent diagnostiqué (31).

Enfin, de nombreux militaires, dans le cadre de la lutte contre l'orpaillage illégal, présentent eux aussi un fort taux d'affections parasitaires intestinales (35).

La problématique

Les helminthiases intestinales sont endémiques en Amérique du Sud mais certaines données épidémiologiques manquent notamment pour la Guyane, le Guyana ou le Suriname, d'où une probable sous-estimation du phénomène dans le plateau des Guyanes (8).

La Guyane française est le territoire d'Amérique du Sud qui présente le plus haut risque pour les populations de développer une helminthiase transmissible par le sol, avec une prévalence de 46,2 % ; la Guyane se trouve en première position pour *Ancylostoma* (36,6%) et *A. lumbricoïdes* (25,1 %) (8). Des résultats similaires chez les pays voisins notamment le Brésil, le Suriname et le Guyana (7,8) ont été rapportés, reflétant l'écologie parasitaire de cette région du monde.

Différentes études épidémiologiques concernant les parasitoses intestinales en Guyane ont été entreprises sur le territoire depuis ces vingt dernières années, ces dernières étant résumées selon la figure 4 :

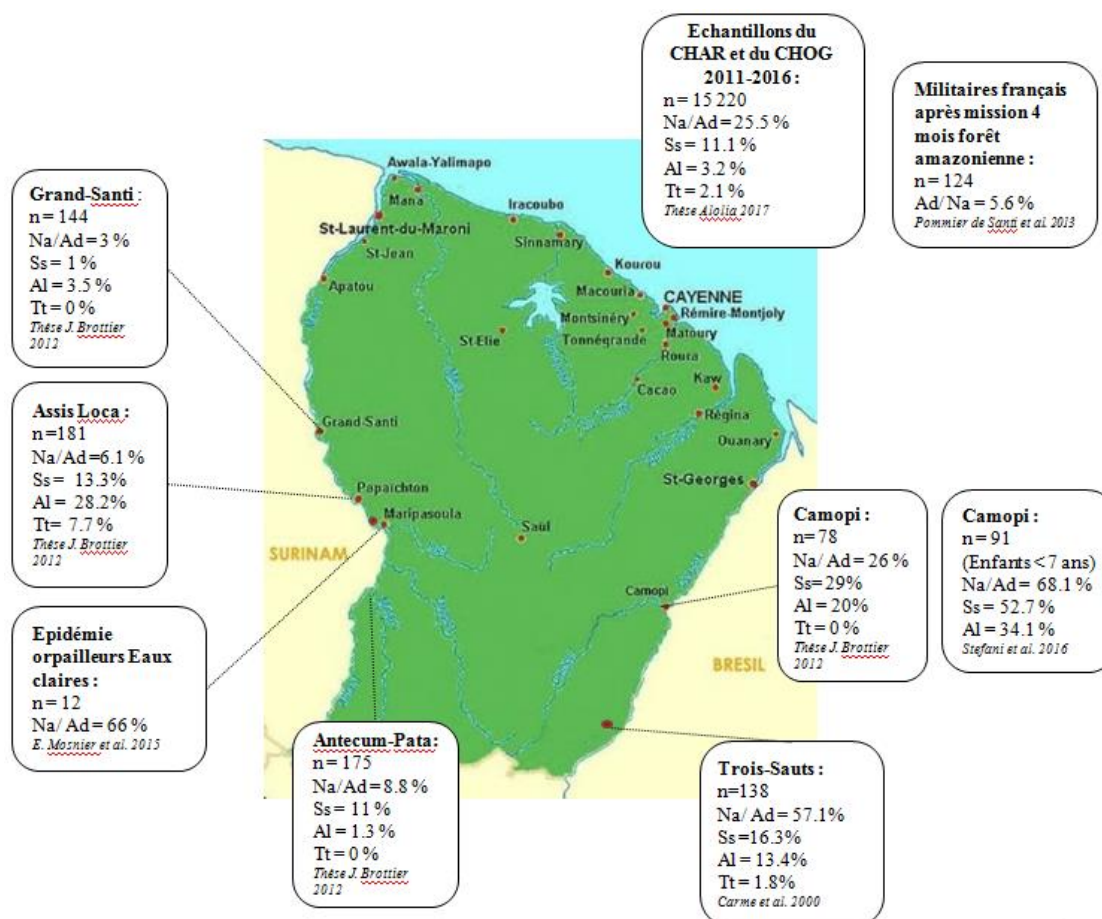


Figure 4 : Synthèse et site des études portant sur les parasitoses intestinales en Guyane française n=nombre d'échantillons, Na=*Necator americanus*, Ad=*Ancylostoma duodenale*, Ss= *Strongyloides stercoralis*, Al= *Ascaris lumbricoides*, Tt=*Trichuris trichiura* (9,10,15,36)

Le nombre d'études reste insuffisant pour une évaluation exacte de prévalence à l'échelle de tout le territoire. On observe une certaine homogénéité de ces affections dans le temps, aucun plan de lutte global contre les parasites intestinaux n'ayant encore été entrepris à grande échelle. L'OMS estime que les zones écologiquement homogènes entre-elles présentent des prévalences homogènes (37).

Ces prévalences établies principalement sur les populations de l'intérieur montrent un taux de parasitisme digestif de 80 % en moyenne bien qu'il varie selon les communautés (9,10,38).

L'étude menée par le Professeur Carme en 2000 dans le territoire amérindien Camopi-Trois-Sauts montre un taux de parasitisme intestinal de 92% avec un biparasitisme de 85 % (9).

En 2010, l'étude rassemblant 91 enfants de moins de 7 ans à Camopi montre un taux de parasitisme intestinal de 86,8% avec un biparasitisme de 65% (38).

Une étude à Maripasoula de 2015 sur 34 orpailleurs touchés par l'épidémie de grippe H1N1 montre quant à elle un taux de 66% de parasitisme intestinal (35).

Dans une étude rétrospective comprenant la totalité des échantillons parasitologiques du CHAR et du CHOG entre 2011 et 2016, on observe un indice parasitaire (IP) (définition en annexe 2) supérieur dans l'Est Guyanais (15). La répartition des différents parasites de cette étude rétrospective est représentée selon la figure 5 ainsi que la répartition de ces parasites selon l'âge et le sexe dans le tableau 2.

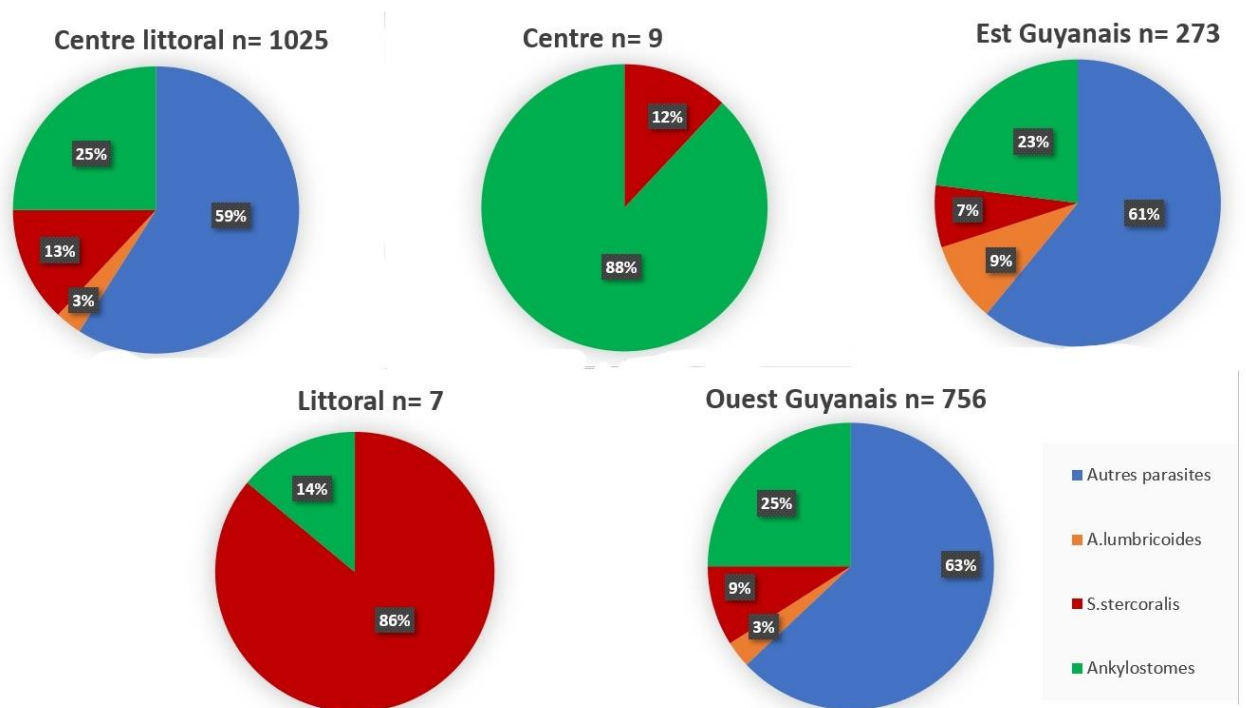


Figure 5 : Répartition des différents helminthes en Guyane française pour les échantillons de selles récoltés au CHAR et au CHOG entre 2011 et 2016 (15)

Tableau 2 : Répartition des helminthiases selon l'âge et la zone géographique d'habitation selon les données collectées entre 2011 et 2016 au CHAR et au CHOG.

Parasite	Total (%) n=941	Sexe H (%)	Âge (années)					Zone géographique					
			<1	1-5	6-17	18-65	>65	CL	OG	EG	C	L	A
<i>Ancylostomidés</i>	546 (25,7)	426 (78,6)	6 (1,1)	17 (3,1)	35 (6,4)	471 (86,6)	15 (2,8)	258 (48,2)	192 (35,8)	62 (11,6)	7 (1,3)	1 (0,2)	16 (2,9)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	235 (11,1)	189 (81,1)	4 (1,7)	8 (3,4)	9 (3,8)	180 (76,6)	34 (14,5)	136 (58,6)	69 (29,7)	19 (5,3)	1 (0,4)	6 (2,6)	1 (0,4)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	67 (3,2)	39 (60,9)	6 (9,0)	21 (31,3)	17 (25,4)	18 (26,9)	5 (7,5)	31 (46,3)	20 (29,8)	16 (23,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

CL : Centre littoral ;

EG : Est Guyanais ; L : littoral ;

C : Centre ; OG : Ouest Guyanais ; A : Autres (métropole, Suriname, Brésil, Antilles, Afrique)

On remarque que l'*Ascaris lumbricoides* est un parasite principalement et majoritairement présent chez les enfants, en accord avec l'épidémiologie mondiale (39). Les individus de sexe masculin sont largement plus atteints que les femmes, regroupant 80 % des diagnostics à *Ancylostoma* et *Strongyloides stercoralis*.

Près d'un quart des échantillons étudiés entre 2011 et 2016 présentait un polyparasitisme, notamment avec des protozoaires témoignant d'un péril fécal.

Le polyparasitisme est davantage retrouvé dans l'Est Guyanais que dans l'Ouest Guyanais (15).

On observe globalement une augmentation des contaminations lors des saisons des pluies (60,3 %) en accord avec les modes de vie des parasites.

Ces études convergent toutes pour affirmer un parasitisme homogène dans le temps avec des infections majoritaires à ankylostomes, anguillule, ascaris et *Hymnolepis Nana* pour les helminthes intestinaux et *E.histolytica* et *G. intestinalis* pour les protozoaires (9,10,15,35,38).

Prévalence de ces parasites selon les régions :

- Ankylostomes (*Nector americanus* et *Ancylostoma duodenale*)

En terme de prévalence, ce parasite est le plus fréquent au sein des géohelminthiases présentes en Guyane (8). Entre 2011 et 2016 on observe que 25,5 % de la totalité des échantillons techniqués au CHAR et au CHOG sont positifs à Ankylostome ; Cette tendance est confirmée grâce aux différentes études menées dans l'Est Guyanais (Camopi, aussi bien chez les enfants que les adultes et Trois-Sauts) ainsi qu'à l'Ouest dans le village amérindien d'Antécum-Pata ou encore chez les militaires ayant séjourné pendant quatre mois en forêt amazonienne, étude menée en 2013.

A contrario, on observe à Assis-Loca et à Grand-Santi une tendance inverse avec une proportion plus importante d'Ascaris et de *Trichuris trichuira*. Compte-tenu de la transmission féco-orale de ces deux parasites, on peut supposer que ce mode de transmission est plus important dans ces régions (33).

- *Strongyloides stercoralis*

Dans la plupart des données récoltées par le Pr Carme, la prévalence de ce parasite est proche de celle retrouvée pour l'ankylostome comme le montrent les prévalences relevées aux villages de Camopi et d'Antecum-Pata, pouvant même être supérieure comme à Assis-Loca. Ces similitudes peuvent être expliquées par le mode de contamination commun transcutané. Effectivement, la marche pieds nus est très fréquente dans ces villages.

Cependant, les disparités observées selon les régions peuvent être expliquées par une différence d'écologie des milieux où se développent les parasites comme le mettent en évidence l'épidémie de diarrhée chez les orpailleurs en 2013 (35) et l'étude chez les militaires après un séjour en forêt amazonienne, toutes deux ne retrouvant que des ankylostomes (40).

- *Ascaris lumbricoides*

On observe pour ce parasite une prévalence plus souvent inférieure ou égale à l'ankylostome comme pour les villages de Grand-Santi, de Camopi, d'Antécum-Pata ou de Trois-Sauts. On observe par ailleurs une plus forte prévalence que les autres Nématelminthes dans le village d'Assis-Loca, particulièrement chez les enfants.

La prévalence est beaucoup plus faible sur l'étude de l'ensemble des prélèvements entre 2011 et 2016, montrant que cette forte prévalence se concentre principalement dans les zones isolées de l'Oyapoque et du Maroni.

I.1.3. Stratégies de lutte de l'OMS

Le principal outil d'estimation permettant la mise en place d'une stratégie de lutte contre les STH au niveau mondial est la prévalence, dont les données sont considérées comme manquantes pour la Guyane (24).

Depuis 1996, l'OMS préconise un traitement systématique de l'ensemble de la population du territoire tous les six mois lorsque le taux de parasitisme intestinal représente plus de 50% des enfants d'âge scolaire (5-14 ans). L'OMS affirme aussi que lorsqu'aucune stratégie de lutte n'a été mise en place, on considère les données anciennes proches des données actuelles de prévalence (39).

L'OMS a déterminé en 2016 que la lutte contre les STH devait être mise en œuvre dans 102 pays soit une évaluation des populations sensibles concernées de 268,8 millions d'enfants d'âge préscolaires, 571,4 millions d'enfants d'âge scolaire et 250 millions de femmes en âge de procréer (41).

L'utilisation d'une chimiothérapie préventive est préconisée lorsque la prévalence est supérieure ou égale à 20% de la population en zone d'endémie selon différentes fréquences dépendant de la prévalence initiale (Figure 6). Aussi, la Guyane est-elle concernée par cette préconisation.

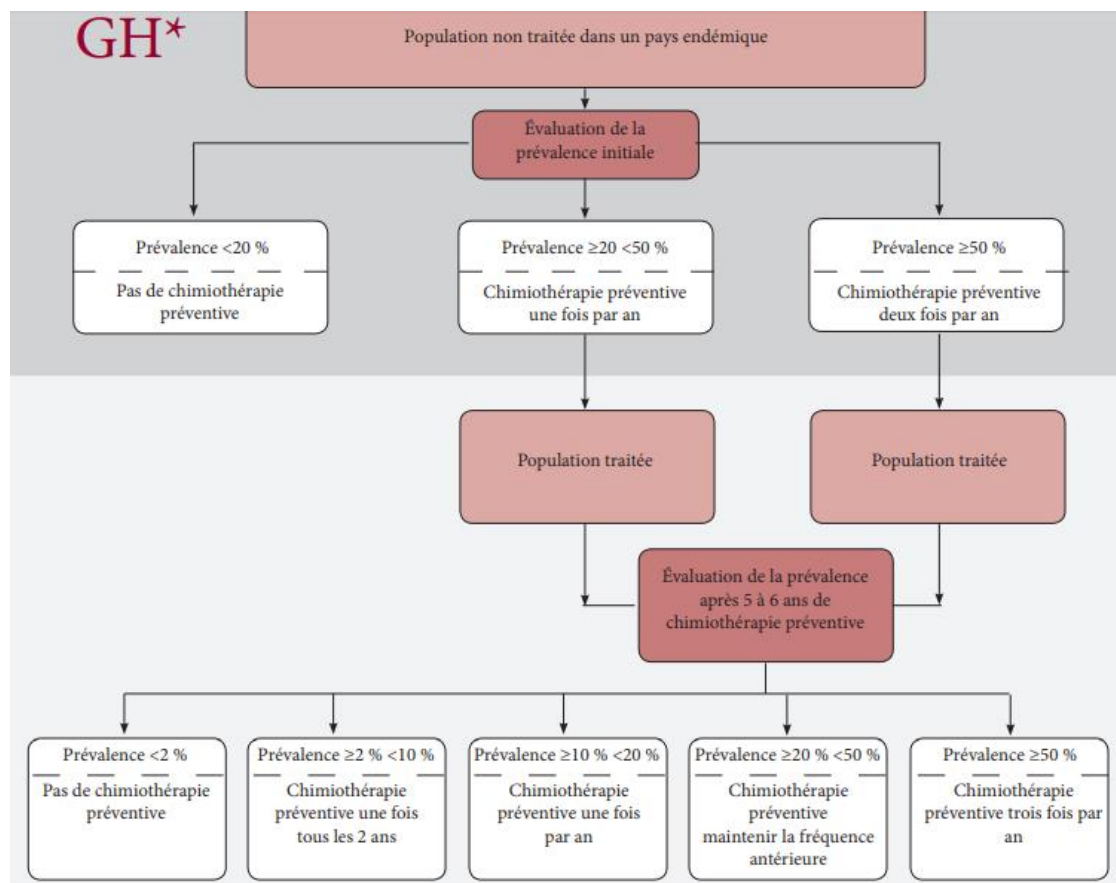


Figure 6 : Organigramme décisionnel de traitement selon l'OMS (41)

Un objectif de traitement a été fixé à 75% des enfants d'âge pré-scolaire et scolaire dans les zones endémiques réparties sur la totalité du globe. Bien que la distribution de traitement dans ces pays endémiques soit gratuite, seulement 42 % des enfants d'âge scolaire ont été traités en 2015, mettant en évidence la difficulté d'exhaustivité d'application de ce genre d'intervention (18).

Malgré cette directive réglementaire, aucun programme de prise en charge des parasitoses digestives n'a été encore mis en place en Guyane.

Le succès de la mise en place des mesures nécessaires à la lutte contre les parasites intestinaux en Guadeloupe entre 1982 et 1987 est un constat encourageant pour la Guyane ; Une diminution de moitié des examens parasitologiques des selles (EPS) positifs directement lié à cette prise en charge globale y a été observée (42).

1.1.4. Traitement médicamenteux

Le développement du parasite étant lié aux conditions environnementales et aux comportements à risques, lutter contre ces facteurs est essentiel pour endiguer les STH. Renouveler de façon périodique ces mesures et les traitements médicamenteux prophylactiques semble nécessaire.

On observe un bénéfice direct du traitement médicamenteux sur les signes cliniques directement imputables à la présence des parasites dans l'organisme mais aussi une amélioration de l'état nutritionnel, une moindre perte de nutriments essentiels notamment lors des hémorragies digestives pour l'ankylostomose, l'amélioration des facultés intellectuelles et d'apprentissage ainsi que la reprise d'un développement staturo-pondéral normal (43). Le traitement médicamenteux de masse permet aussi de diminuer la charge parasitaire dans les sols donc la réinfection des individus.

L'albendazole et le mébendazole sont les traitements recommandés par l'OMS pour les STH ; Ils sont tous deux similaires quant à leur mode d'action et leur efficacité. Ces molécules parasitocides agissent sur le cytosquelette des helminthes en inhibant la polymérisation des tubulines et leur incorporation dans les microtubules, bloquant ainsi l'absorption du glucose par ces parasites. Ces deux molécules ne doivent pas être utilisées lors du premier trimestre de grossesse.

Le traitement contre l'anguillulose ne fait pas partie des stratégies de traitement de masse proposées par l'OMS. Ce parasite s'avère d'avantage sensible à l'ivermectine qui provoque une paralysie neuromusculaire en interrompant la neurotransmission induite par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) du parasite. Cependant, l'anguillulose est couverte par le traitement utilisé dans le déparasitage de l'onchocercose et de la filariose lymphatique mis en place par l'OMS.

Les déparasitages scolaires ont montré leurs effets bénéfiques dans certaines régions (44,45) mais restent encore controversés par certaines études qui doutent de leur efficacité (46,47). L'émergence de résistance aux anti-helminthiques est constatée dans le monde vétérinaire où des traitements répétés sont entrepris, particulièrement dans les élevages de bétail (48,49). La stratégie actuelle de lutte contre les STH n'utilisant que les benzimidazolés font redouter l'émergence de résistances similaires chez les humains par pression médicamenteuse. Ces mécanismes ne sont cependant pas encore observés chez les humains, l'absence de test biologique et moléculaire fiable ne permettant pas d'évaluer ou de prédire la propagation de ces mécanismes de résistance (50).

I.2. Caractéristiques des principaux némathelminthes

I.2.1. Classification

Les Helminthes se différencient des arthropodes au sein des métazoaires par leur musculature lisse, l'absence d'appareil respiratoire ou circulatoire et de cavité coelomique. Ce groupe constitue un phylum hétérogène qui se trouve toujours caractérisé par un corps allongé sans appareil locomoteur avec une symétrie bilatérale. Au sein des Helminthes, les némathelminthes se distinguent par leur paroi tégumentaire. Les némathelminthes, vers ronds, présentent une cuticule ou des téguments chitineux, une cavité viscérale vide et un tube digestif contrairement aux plathelminthes, caractérisés par des téguments non chitineux, une cavité viscérale parenchymateuse, et un corps aplati (51).

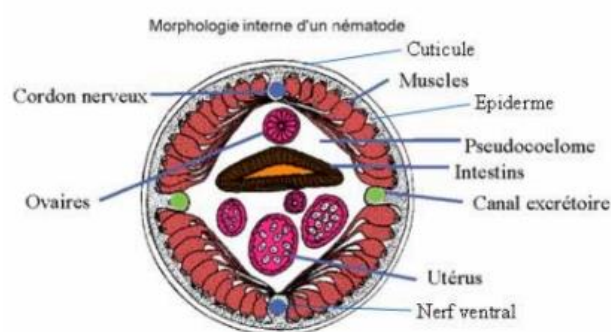


Figure 7 : Schéma de la morphologie interne d'un nématode

Au sein des némathelminthes, on distingue :

- les nématodes digestifs caractérisés par une localisation digestive, dotés d'un utérus produisant des œufs tels que : Ascaris, Oxyure, Anguillule, trichocéphale, Ankylostoma et Necatorspp.
- les nématodes tissulaires dont la localisation est tissulaire, dotés d'un utérus produisant des larves : Loa loa, Onchocerca, Dirofilaria, Dracuncula, Angiostrongylus appartenant aux filaires.

I.2.2. Ecologie, transmission et mode de contamination

I.2.2.1 Ankylostomes: Necator americanus et Ancylostoma duodenale

Ces deux espèces d'ankylostomes sont retrouvées chez l'Homme et caractérisées par une contamination par voie transcutanée.

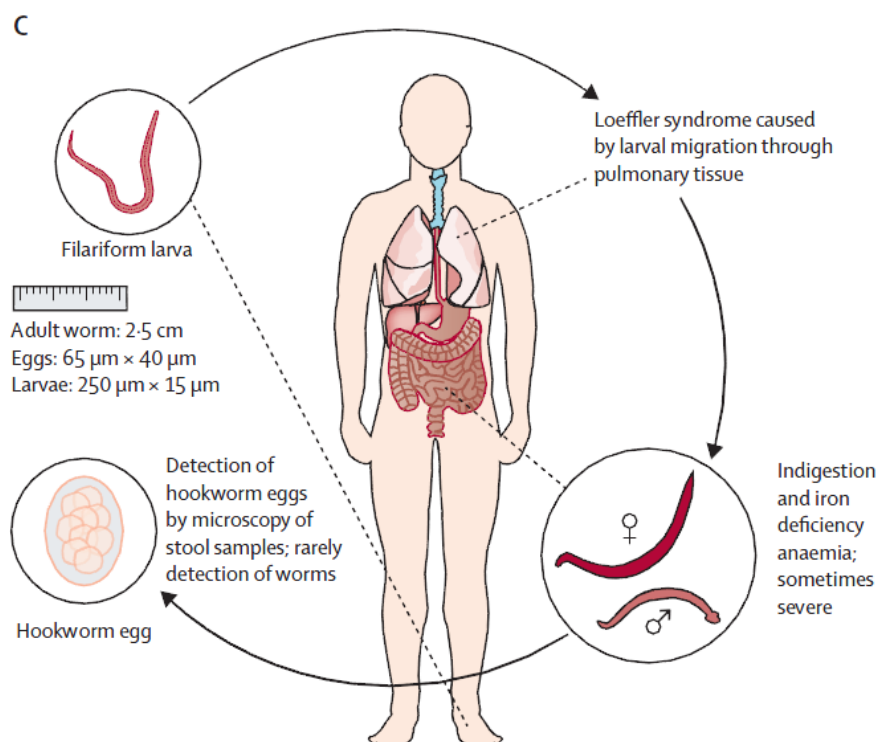


Figure 8 : Cycle parasitaire de l'Ankylostome

Après pénétration transcutanée, le parasite accède par voie sanguine ou lymphatique au cœur puis au poumon, aux bronches, remonte jusqu'à la trachée avant d'être dégluti et de s'insérer dans la muqueuse intestinale. Les œufs émis dans les selles après fécondation des adultes sont non-embryonnés et se développent dans le milieu extérieur dans des conditions de température favorable soit entre 22 et 26 °C pour *Ancylostomaduodenale* et 27 à 30 °C pour *Necatoramericanus*. Les oeufs embryonnés se transformant en larves rhabitoïdes L1 puis strongyloïdes L2 puis L3 infestantes. Ces larves sont très résistantes et peuvent survivre jusqu'à 10 mois dans le sol et 18 mois dans l'eau.

I.2.2.2 Strongyloïdes stercoralis

La strongyloïdose est due au parasite *S.stercoralis* et parfois à *S. fuelleborni*, ce dernier touchant principalement les primates et est retrouvé en Afrique et en Asie du sud-est. Cette parasitose touche l'homme mais aussi le chien et le chat.

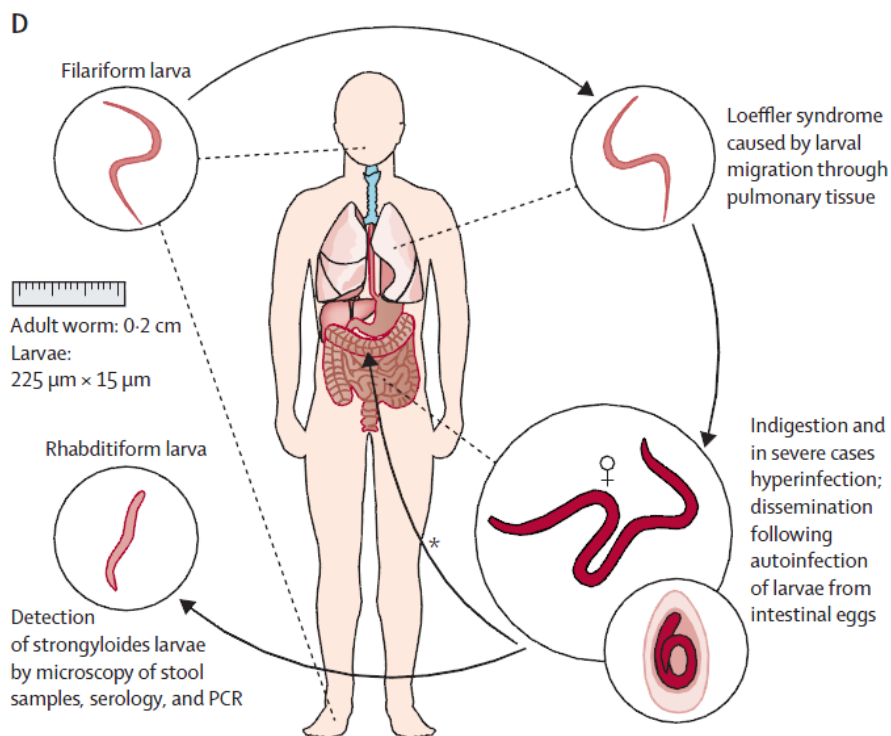


Figure 9 : Cycle parasitaire de *Strongyloides stercoralis*

Le cycle parasitaire est complexe chez l'homme. Ce sont les larves infestantes type L3 retrouvées dans le milieu extérieur qui pénètrent par voie transcutanée avant de gagner les voies sanguines ou lymphatiques puis successivement le cœur droit, les poumons puis la trachée par remontée du carrefour aéro-digestif. Ces larves s'insèrent dans la muqueuse duodéno-jéjunale après déglutition. C'est ainsi que la femelle parthénogénétique -pouvant s'auto-féconder- pond ses œufs un mois après son installation.

Les œufs deviennent des larves type L1 migrant dans la lumière intestinale. Ces larves ont plusieurs issues :

- éliminées dans le milieu extérieur, elles se transforment en larves L2 devenant à leur tour des larves L3 infestantes. Il s'agit d'un cycle court, externe et asexué de type direct. Ce cycle a une durée de 36 h si les conditions extérieures sont défavorables soit une température inférieure à 20 °C et un taux d'humidité faible.

- éliminées dans le milieu extérieur avec des conditions favorables ces larves L1 se transforment successivement en L2 puis L3 infestantes donnant alors en deux à trois jours des adultes mâles et femelles permettant un accouplement et la ponte de nouveaux œufs dans le milieu extérieur. Il s'agit d'un cycle long, externe, sexué et indirect.

- le cycle court interne asexué correspond à un cycle d'auto-infestation caractérisé par le développement des larves L1 en larves L3 dans l'intestin du malade. Ces larves infestantes pénètrent alors directement la muqueuse intestinale et gagnent le poumon par voie sanguine et deviennent ainsi adultes dans l'intestin.

L'emballement du cycle d'auto-infestation se retrouve dans le cas d'une immunodépression caractérisant l'anguillulose maligne. La symptomatologie varie en fonction du statut immunitaire des patients, pouvant être asymptomatique chez 50 % des patients immunocompétents (20).

I.2.2.3 *Ascaris lumbricoides*

Le cycle de d'*Ascaris lumbricoides* est un cycle monoxène direct, la contamination s'effectue par ingestion d'œufs par les eaux de boissons, les aliments ou les sols contaminés.

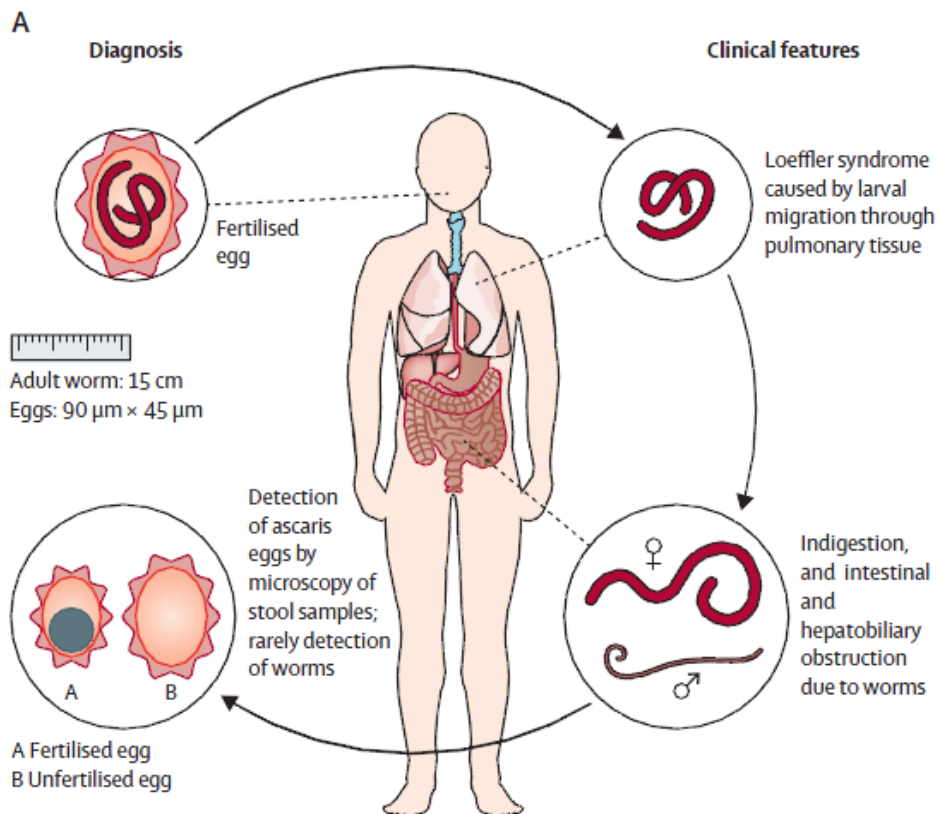


Figure 10 : Cycle parasitaire de l'*Ascaris lumbricoides*

Les œufs ainsi ingérés deviennent des larves qui traversent la paroi intestinale, gagnent le foie par la veine porte puis le cœur droit, arrivant à l'artère pulmonaire en deux à trois jours. Au bout d'une semaine, ces larves franchissent la paroi alvéolo-capillaire, passent dans l'arbre trachéo-bronchique, remontent jusqu'à la trachée et sont dégluties. Elles arrivent au niveau du jéjunum où, après maturation, les femelles commencent à pondre après une semaine.

I.2.3. Synthèses épidémiologique et parasitologique des 4 principaux helminthes

Les données issues de la littérature concernant les 4 principales espèces d'helminthes digestifs (*S.stercoralis*, *A.duodenale*, *N.americanus*, *A.lumbricoides*) sont résumées dans les tableaux 3 et 4 suivants :

Tableau 3 : Caractéristiques parasitologiques selon ANOFEL 2014

Parasite	<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Ancylostoma duodénale</i>	<i>Necator Americanus</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
Hôte principal	Homme			
Mode de contamination	transcutané	transcutané	Transcutané, voie buccale, transplacentaire ou lors de l'allaitement	orale
Forme infestante	Larves L3 infestantes			oeufs
Habitat adulte	Muqueuse duodéno-jéjunale			jéjunum
Temps de maturation des oeufs	Pas de données	7 jours		8-10 jours
Durée de vie parasite adulte	Pas de données	5-7 ans		1 an
Nombres d'œufs par femelle	20 à 50 / femelle	25 000 – 30 000	9000-10 000	200 000
Localisation finale des œufs	Maturation des œufs en larves au niveau de l'intestin. Larves dans les fèces puis dans les sols	Œufs éliminés dans les fèces puis se transforment en larves		Œufs passent via les fèces dans le sol
Cycle évolutif	Cycle court asexué ou cycle d'auto-infection	Cycle direct long		Cycle direct sans hôte intermédiaire
Durée du cycle	27 jours	50-60 jours		60-90 jours
Localisation des adultes	Petit intestin	Muqueuse intestinale		Jéjunum

Tableau 4 : Caractéristiques clinico-biologiques des Helminthes étudiés.

Parasite	<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Ancylostoma duodénale</i>	<i>Necator Americanus</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
Manifestations cliniques (18)	Phase d'invasion : éruption papuleuse au point d'inoculation et/ou des réactions allergiques : urticaire, prurit	Pénétration cutanée : dermatite prurigineuse, érythème maculoprurigineux fugace, « gourme » des mineurs		Phase d'invasion : syndrome de Loëffler
	Phase de migration larvaire : toux irritative, dyspnée asthmatiforme, syndrome de Loëffler	Phase larvaire d'invasion : irritation des voies aériennes supérieures ou catarrhe des gourmes, manifestations allergiques		Phase d'état : douleurs abdominales, nausées, vomissements,
	Phase d'état : syndrome douloureux abdominal à type d'épigastralgies pseudo-ulcéreuses, dyspepsie, diarrhée et constipation	Phase d'état intestinale avec troubles digestifs et anémie		Douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhées, syndrome dyspepsique
	Cycle d'auto-réinfection interne : larva currens			
Anguillulose maligne : défaillance multiviscérale				
Complications	dissémination larvaire multiviscérale chez les sujets immunodéprimés (18) (VIH, HTLV1, alcoolisme)	Malnutrition Retard de croissance et troubles cognitifs enfant (26) Grossesse : retard de croissance in utero, prématurité accrue, augmentation décès maternel, anasarque dû à l'hypoalbuminémie (5)		Tableaux chirurgicaux : occlusion, appendicite Médicaux : angiocholite, colique hépatique, péritonite, ascaridiose biliaire pancréatique Malnutrition chez l'enfant, retard staturo-pondéral(52)
Manifestations biologiques	Hyperéosinophilie durable et fluctuante. Eosinopénie lors d'une anguillulose maligne	anémie microcytaire hypochrome hyposidérémique arégénérative hyperleucocytose due à une hyperéosinophilie maximum au 3ème mois. hypoprotidémie		Hyperéosinophilie courbe de Lavier
Prévention	Lutte contre le péril fécal, port de chaussures(20)	Péril fécal : prévention collective et individuelle, accès à l'eau, mise en place de sanitations, de latrines, éducation au lavage des mains,...(21)		

II. Diagnostic biologique standard des helminthiases intestinales

Cette partie a pour objectif de décrire les différentes techniques actuelles de diagnostic des helminthiases en biologie médicale. Nous expliquerons les différentes étapes requises pour une observation microscopique parasitologique, actuel gold standard, outil utilisé en routine au laboratoire du CHAR puis nous aborderons les nouvelles technologies reposant sur la biologie moléculaire.

II.1. Le diagnostic microscopique

L'examen microscopique des selles à la recherche de parasites adultes, d'œufs ou de larves s'effectue sur selles fraîches rapidement acheminées au laboratoire, ce délai ne devant pas excéder 24h à température ambiante pour apprécier l'observation de larves vivantes et d'œufs d'helminthes. Un examen parasitologique des selles s'effectue sur trois selles différentes idéalement réparties sur trois jours consécutifs pour améliorer la sensibilité de l'examen car l'obtention de plusieurs selles diminue la survenue de faux négatifs consécutifs à l'excrétion intermittente de parasites dans les selles (53). Un fixateur au lugol tel que la technique MIF (Merthiolate - Iodine - Formaldéhyde) peut être utilisé pour figer et conserver les formes végétatives des protozoaires jusqu'à trois semaines et ainsi palier au retard d'acheminement ; l'utilisation d'un tel produit n'est cependant pas compatible avec l'analyse par biologie moléculaire.

II.1.1. Examen macroscopique

Afin d'orienter le diagnostic des parasitoses intestinales, les selles fraîches font tout d'abord l'objet d'un examen macroscopique à l'œil nu comprenant la couleur, la consistance, la présence d'éléments anormaux : sang, glaire, mucus ou encore la présence de parasites adultes visibles à l'œil nu tels que les vers adultes d'*Ascaris lumbricoides*.

II.1.2. Examen microscopique des selles

II.1.2.1 Examen direct ou état frais

Celui-ci est réalisé par un opérateur entraîné à partir de selles fraîches ou de selles fraîches diluées dans une goutte d'eau physiologique entre lame et lamelle. Cette étape permet la visualisation de larves de *Strongyloides stercoralis* en cas d'infestations massives, ou d'œufs ainsi que la mise en évidence de cristaux de Charcot-Leyden témoignant de la destruction intraluminaire des polynucléaires éosinophiles directement liée au mode d'action des helminthes (54).

II.1.2.2 Techniques de concentration

Ces techniques permettent de concentrer les parasites, d'éliminer l'excès de débris alimentaires ou de bactéries pouvant gêner la lecture et influencer sur la sensibilité de l'examen. Diverses techniques sont utilisées reposant sur trois principes : la flottation, la technique formol-éther basée sur la non-miscibilité de deux phases et enfin l'utilisation d'agents éclaircissants.

La technique recommandée par l'OMS est celle de Kato-Katz qui est une technique de concentration par éclaircissement utilisée pour détecter la présence d'œufs d'helminthes dans les échantillons fécaux se définissant comme l'examen de choix pour le diagnostic des helminthiases intestinales. En effet, cet outil est largement utilisé à l'échelle mondiale dans l'établissement de prévalence dans les programmes de lutte contre les STH (55) n'étant pas cher, facile d'utilisation et ne requérant pas d'automates ; il est particulièrement adapté aux études de terrain . Il s'agit d'un frottis épais de selles que l'on recouvre d'un rectangle de cellophane imprégné depuis au moins 24h de glycérine ajoutée au vert de malachite permettant la coloration et l'éclaircissement des œufs d'helminthes. La lecture s'effectue après une heure à température ambiante. Cette technique permet la détection de *T. trichiura*, *A.lumbricoïdes*, *S.mansoni*, *A.duodenale* et *N.americanus* mais ne permet que rarement d'observer des larves d'anguillule d'où une faible sensibilité pour la détection de ce parasite par cette technique (56).

Les techniques de flottation permettent de concentrer les œufs d'helminthes grâce à un phénomène d'entraînement à la surface d'éléments parasites par addition d'une solution de densité supérieure. Celle-ci peut être de l'eau saturée en chlorure de sodium, du sulfate de zinc ou une solution iodo-mercurique. Ces techniques présentent une sensibilité bien inférieure à la technique Kato-Katz pour la détection d'œufs d'helminthes particulièrement pour les ankylostomes (44).

Inspirée des techniques de flottation, la technique FLOTAC a été utilisée dans le monde vétérinaire (57) avant de trouver sa place dans le diagnostic parasitologique humain (58) ; Son principe repose sur la combinaison de la flottation à deux étapes de centrifugation. Elle est caractérisée par une meilleure sensibilité que la technique Kato-Katz pour les œufs d'helminthes notamment par une quantité de selles étudiée plus importante (59). Cette technique permet aussi la mise en évidence de larves d'anguillule en moins de 24 h même après conservation de l'échantillon dans du formol, la vitalité des larves n'étant pas nécessaire à son utilisation (60). L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle est coûteuse et requiert un laboratoire équipé de centrifugeuse, peu disponible pour de nombreux laboratoires des pays en voie de développement.

Pour ces laboratoires, la technique mini-FLOTAC est plus adaptée car elle repose sur la même technique mais fait abstraction des étapes de centrifugation, l'appareil est transportable, l'échantillon filtré pourra être examiné après 5 à 10 minutes en utilisant un microscope standard avec une bonne sensibilité équivalente à la technique de Kato-Katz (61).

Les techniques diphasiques telles que Bailenger, Ritchie et MIF concentrent les éléments parasites en utilisant deux phases non miscibles, une phase aqueuse et un solvant de lipides comme l'éther. Cette concentration résulte des forces d'attraction qu'exercent les deux phases sur les particules fécales hérissées de groupements hydrophiles et lipophiles, les débris lipophiles sont éliminés après centrifugation (62). Ces techniques permettent l'observation de kystes de protozoaires, l'observation d'œufs de certains helminthes comme *Ascaris lumbricoides*, les schistosomes, les ankylostomes, *Trichuris trichiura* et les cryptosporidies.

Ces techniques de concentration peuvent être suivies d'une quantification des œufs fécaux par comptage ; elles évaluent le nombre d'éléments parasitaires (œufs, larves, oocystes) présents dans les échantillons fécaux, exprimés par gramme de fèces (57).

Bien que la technique FLOTAC montre dans de nombreuses études une sensibilité plus élevée que le Kato-Katz -estimée entre 81 % et 97 % alors que celle du Kato-Katz est de 74 à 95 % pour des examens répétés à trois reprises sur des infections de forte intensité et pouvant diminuer jusqu'à 53% pour les infections de faibles intensités- cette dernière reste la méthode universelle de choix pour le diagnostic parasitologique microscopique grâce à son faible coût et sa facilité d'utilisation (59).

Les caractéristiques microscopiques des éléments parasitaires nécessaires au diagnostic de ces helminthiases sont regroupées en annexe 3.



Figure 11 : (A) œufs d'*Ascaris lumbricoides*, (B) œufs d'ankylostome, (C) larve d'ankylostome, (D) larve de *Strongyloides stercoralis*

II.1.3. Techniques spécifiques à *Strongyloides stercoralis*

Technique de Baermann

La technique de Baermann est la technique de référence dans le diagnostic de l'anguillulose ; il s'agit d'une technique de concentration se basant sur les caractéristiques d'hygrotopisme et de thermotropisme des larves rhabitoïdes (56). Les selles déposées sur une couche de gaze sont placées dans un entonnoir dont l'extrémité inférieure est remplie d'eau à 45 °C permettant aux larves de profiter d'une température optimale et donc de se concentrer vers le bas de l'entonnoir. Après deux heures et une étape de centrifugation on peut observer au microscope les larves vivantes mobiles concentrées. La concentration larvaire de la technique de Baermann permet d'augmenter la sensibilité de la lecture microscopique (63).

L'avantage de cette méthode est sa simplicité, son faible coût, sa faculté à ne pas déformer les larves et à éliminer les débris, cependant elle ne permet que l'observation de larves, celles-ci devant être vivantes ; cette technique nécessite donc des selles fraîches pour son application.

La méthode de Baermann présente une sensibilité légèrement inférieure aux techniques de coproculture mais présente une mise en place plus simple, moins chère, plus rapide et un risque de contamination moindre du personnel de laboratoire.

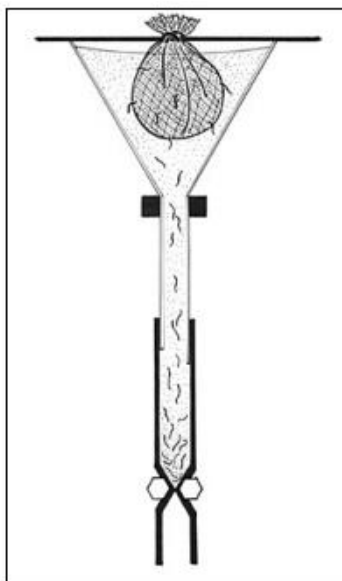


Figure 12 : Schéma d'une méthode de Baermann

Coprocultures

Au sein des coprocultures nous décrivons la technique d'ARAKAKI qui est la plus sensible avec une sensibilité atteignant les 90 % (64), il s'agit d'une technique sur gélose qui permet grâce à l'apposition de selles sur un plateau de gel nutritif dans une boîte de pétri d'observer après une incubation de deux jours les sillons des larves migrantes ou de formes adultes de *S.stercoralis* à l'aide d'une loupe binoculaire. L'observation des sillons permettra de différencier les larves d'anguillule de celles du groupe des ancylostomidés selon leur trajectoire.



Figure 13 : Observation des sillons des larves de *Strongyloides stercoralis* (A) et d'ancylostomidé (B) au microscope x100 selon la méthode d'ARAKAKI (65)

Ces deux techniques nécessitent l'obtention de selles fraîches et non réfrigérées car elles reposent sur le caractère migratoire des larves vivantes, la réfrigération pouvant tuer les larves. L'excrétion de celles-ci étant intermittente, il est nécessaire de réitérer les examens pour s'assurer de leur négativité.

II.2. Diagnostic sérologique

La réponse immunitaire aux infections parasitaires intestinales varie en fonction de l'âge, de l'intensité de l'infection particulièrement dans les zones de forte endémie, du terrain génétique, du statut nutritionnel et de surtout le statut immunitaire des patients, tous ces paramètres peuvent moduler la production d'anticorps spécifiques (66,67).

Le diagnostic immunologique des helminthiases trouve sa place lorsque l'EPS est négatif par microscopie. Il repose sur la détection d'anticorps spécifiques. Ces techniques reposent sur le principe du test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) qui met en évidence la présence d'anticorps spécifiques par l'utilisation d'anti-immunoglobulines conjuguées. Une réaction colorée se produit lors de l'action sur un substrat d'une enzyme fixée sur ces anti-immunoglobulines. Les formes dérivées de cette technique sont aussi utilisées comme le Dot-ELISA, la fluorescence directe ou indirecte, l'immunoblot, l'immunoprécipitation par le système luciférase (LIPS) ou quelques tests rapides reposants sur l'immuno-chromatographie (68).

Cependant, l'interprétation des tests sérologiques est difficile car il existe un risque de surestimation des infections compte-tenu du fort taux d'anticorps des populations dans les régions endémiques ainsi que de la disparition totale tardive -de 6 mois en moyenne- des anticorps spécifiques après traitement (52,69) ou parfois une absence de diminution des anticorps malgré des traitements itératifs sur plusieurs mois (70).

De même, la spécificité du dosage des anticorps est faussée par des réactions croisées au sein des STHs (18). Cependant, au fil des années, plusieurs tests ELISA ont été proposés pour améliorer la spécificité des anticorps dosés par sélection d'IgG spécifiques (70).

Pour *S.stercoralis*, de nouvelles techniques ont vu le jour comme le système d'immunoprécipitation à la luciférase (LIPS) reposant sur le principe d'expression de gènes codants pour des antigènes fusionnés à la luciférase dans les cellules de mammifères afin d'extraire des RUC-antigènes utilisés pour capter les anticorps spécifiques par immunoprécipitation. L'association de l'antigène recombinant spécifique NIE, dérivé d'une protéine de surface des larves L3 de *S.stercoralis*, et de la technique LIPS permet d'augmenter à 100 % la spécificité contre 95 % pour les tests ELISA (71). De nombreux avantages sont à constater pour cette technique : aucune

réaction croisée n'a été identifiée pour ce test, il permet de détecter de faibles variations d'anticorps et permettrait de suivre leur diminution lors de traitements anti-helminthiques ce que le test ELISA n'est pas capable de faire. Enfin il s'avère être un test rapide (moins de trois heures) et des versions encore plus rapides sont en cours d'étude ce qui permettra d'inscrire cette technique comme outil fiable et rapide dans le diagnostic de l'anguillule (68). Cette technique n'est cependant pas encore commercialisée et ne reste actuellement utilisable qu'au stade de recherche (14).

Pour conclure, les tests sérologiques présentent une bonne sensibilité et un avantage par rapport au caractère itératif des EPS compte tenu des variations d'excrétion des parasites dans les selles ; ils trouvent notamment leur utilité dans les pays non endémiques puisque la forte prévalence des parasitoses dans les zones endémiques rendent impossible l'utilisation de la sérologie dans les programmes de contrôle à grande échelle (14). Cependant, ces tests ne permettent pas de différencier des infections anciennes ou actives, sauf pour la recherche de copro-antigènes spécifiques (72) et malgré leur bonne spécificité ils présentent encore des contaminations croisées avec les autres Nématodes. Une des principales utilisations de la sérologie est dans le dépistage des strongyloïdoses chez des patients à risque de développer des hyperinfections par modification de leur statut immunitaire, bien que la disparition des anticorps spécifiques soit observée dans certains cas (73). Finalement, s'ils sont retrouvés positifs, ces tests incitent à la réalisation d'EPS comme confirmation d'infection active.

III. Nouvelles approches diagnostiques

III.1. La biologie moléculaire : principe de la PCR (polymérase Chain Reaction)

Depuis plusieurs années, le développement des techniques de biologie moléculaire dans le domaine microbiologique est en plein essor. En Parasitologie, les problématiques liées au manque de sensibilité et de spécificité des outils actuels, incitent à positionner à terme la PCR comme gold standard (59). En effet, l'amélioration du diagnostic et la possibilité d'un suivi de ces maladies semblent nécessaires pour une détermination précise des prévalences et une prise en charge globale dans les régions du monde impactées par ces maladies.

Principe

La PCR permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN ou d'ARN. Il s'agit d'une succession de réactions de réplication permettant d'amplifier plusieurs millions de fois la séquence d'intérêt. La quantification d'ADN obtenu se fait ensuite par migration sur gel d'agarose (74).

La PCR repose sur le mécanisme de réplication de l'ADN, celle-ci nécessite l'action d'une ADN polymérase (la Taq polymérase), enzyme permettant la copie d'un brin complémentaire de l'ADN simple brin ciblé grâce à l'inclusion dans le milieu réactionnel d'amorces nucléotidiques se fixant sur deux brins monocaténaux. Un cycle de PCR se déroule en quatre étapes comme représenté dans la figure 14 :

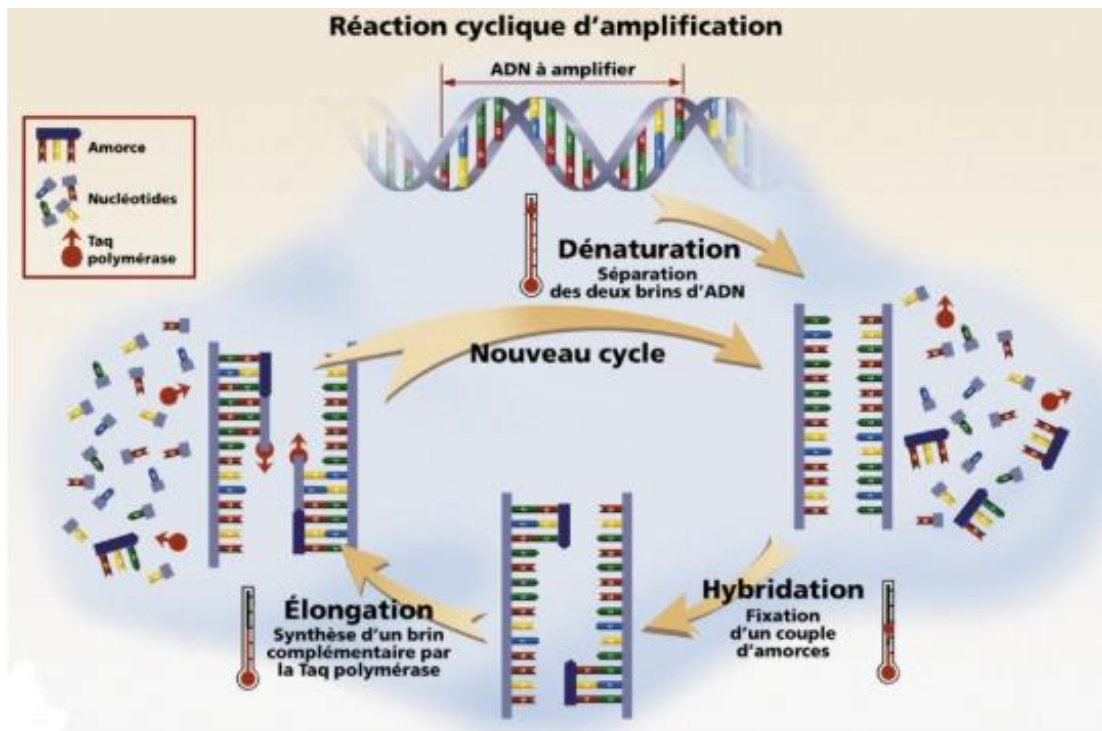


Figure 14 : Schéma d'un cycle de PCR.

La première étape est celle de dénaturation, le chauffage provoque la séparation des doubles brins d'ADN aboutissant à l'obtention de simples brins, les amorces sont libres dans le milieu. Lors de l'hybridation, les amorces nucléotidiques se fixent aux extrémités des séquences à amplifier. L'élongation ou polymérisation fait intervenir l'ADN polymérase qui permet l'extension des brins d'ADN. Chaque cycle de PCR est répété une quarantaine de fois et l'amplification est exponentielle, aboutissant à plusieurs millions de copies. La PCR dite classique nécessite une deuxième étape de quantification d'ADN à l'aide d'une migration sur gel d'agarose de produits amplifiés grâce à l'utilisation de produits intercalants de l'ADN.

III.2. La PCR en temps réel ou qPCR

III.2.1. Le principe technique et les différentes approches

De nouvelles technologies de PCR quantitatives ont vu le jour ces dernières années, il s'agit de PCR en temps-réel (qPCR), elles permettent ainsi par l'utilisation de sondes ou de produits se fixant au petit sillon de l'ADN double brin (STBR Green I), d'émettre un signal fluorescent directement proportionnel à la quantité d'ADN amplifié en temps réel (75,76). Différentes techniques sont disponibles : La technique par hydrolyse de sonde (Taqman), la technique par hybridation de deux sondes Fluorescence resonance Energy Transfer (FRET) et l'utilisation de balises moléculaires (Molecular Beacons).

- Technique TAQMAN :

Les sondes utilisées par la technique Taqman sont les plus utilisées. La sonde 'TaqMan' est une séquence oligonucléotidique spécifique de la matrice, marquée en 5' par un fluorochrome (reporteur) dont la fluorescence est inhibée par un désactivateur (quencher) en 3'. Le principe repose sur l'activité exonucléase de la Taq qui va hydrolyser la sonde lors de l'amplification libérant le fluorochrome reporteur. La fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés lors de la PCR.

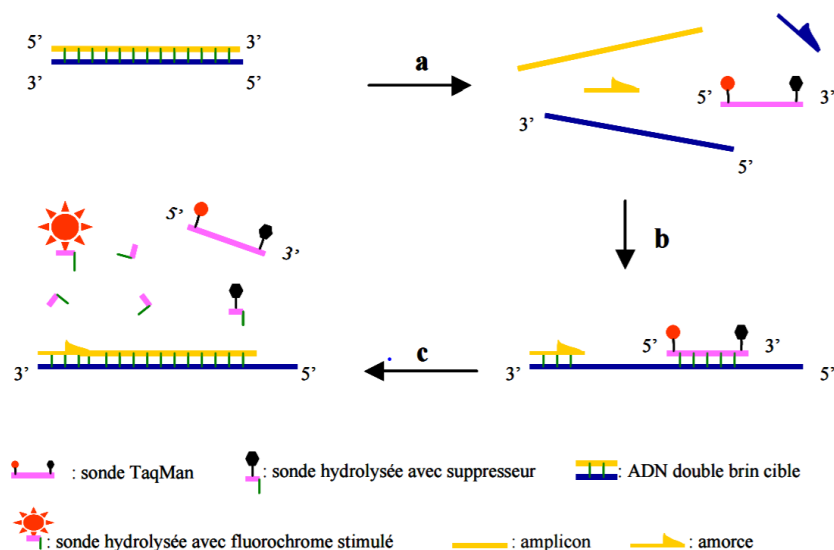


Figure 15 : Principe des sondes Taqman

Lors de l'étape de dénaturation (a), le chauffage provoque la séparation des doubles brins d'ADN avec la présence de sondes et d'amorces libres dans le milieu. Aucune fluorescence n'est observée lors de cette étape, le reporteur étant proche du quencher.

Lors de l'hybridation (b) les amorces se fixent aux extrémités des séquences à amplifier et la sonde s'hybride sur la séquence cible correspondante. L'élongation ou polymérisation (c) fait intervenir la Taq polymérase qui, en synthétisant le brin complémentaire, va lyser la sonde entraînant une libération du reporteur et l'émission d'une fluorescence détectée par le thermocycleur.

- **Technique FRET :**

La technique FRET utilise deux sondes linéaires complémentaires d'une séquence cible l'une étant marquée en 3', l'autre en 5' par un marqueur. La proximité des deux fluorophores sur l'ADN cible permet un transfert d'énergie quantifié par une fluorescence rouge.

- **Technique MOLECULAR**

La technique molecular beacons fait appel à une sonde en épingle à cheveux équipée d'un fluorophore émetteur et d'un fluorophore suppresseur (quencher). Lors de l'hybridation une émission de fluorescence est observée par éloignement des deux sondes, puis l'élongation libère la balise et arrête alors toute émission de fluorescence permettant de quantifier la quantité d'ADN amplifiée. Cette technique est très spécifique mais les sondes restent difficiles à designer.

III.2.2. Expression des résultats de PCR en temps réel

La représentation sous forme de courbe sigmoïde d'une réaction de PCR en temps réel est définie telle que montre la figure 16 :

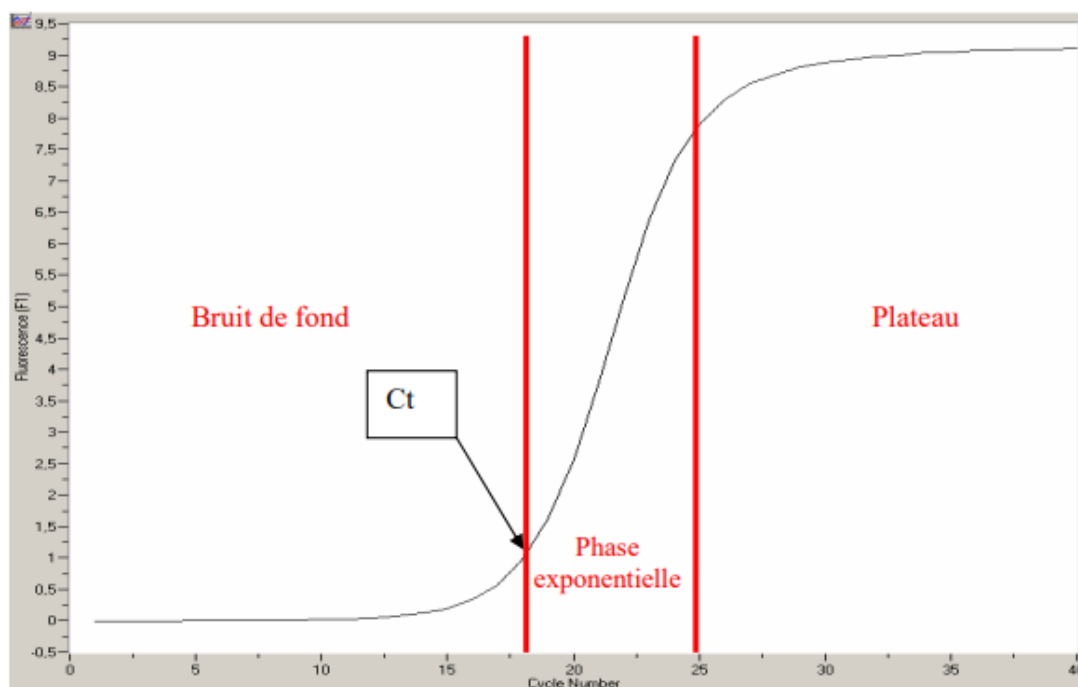


Figure 16 : courbe sigmoïdale d'une réaction de PCR.

La fluorescence émise à chaque cycle de PCR représente la quantité de produits amplifiés en temps réel. Plus l'échantillon présentera une concentration élevée de molécule cible à amplifier, moins il faudra de cycles pour atteindre un signal significativement supérieur au bruit de fond (Ct).

On distingue trois phases :

- phase de bruit de fond : quantité insuffisante de fragments amplifiés pour émettre une fluorescence.
- phase exponentielle : la quantité de fluorescence générée par les fragments amplifiés est significativement supérieure au seuil de détection de l'appareil. Le nombre de produit amplifié double à chaque cycle. Cette phase est représentée par une droite en coordonnées logarithmiques.
- phase de plateau : ralentissement de l'amplification dû à l'épuisement d'un réactif de la PCR.

La valeur seuil Ct est calculée automatiquement par le logiciel et se trouve inversement proportionnelle au logarithme décimal de la quantité d'ADN initiale.

III.2.3. Validation des performances de l'amplification

L'efficacité de la PCR se calcule à partir de la pente de la courbe standard (figure 16) :

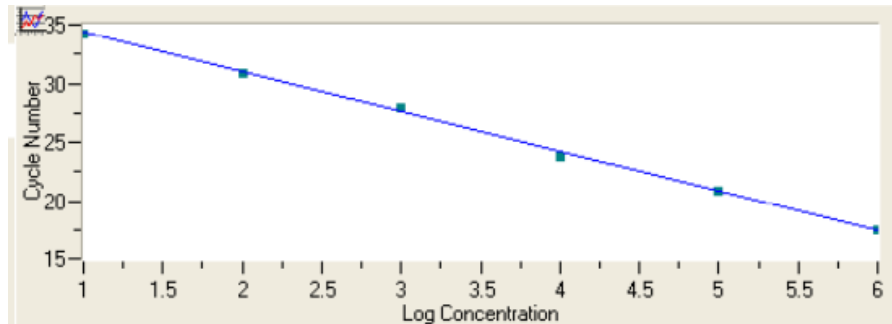


Figure 17 : Droite standard établie à l'aide d'une gamme d'étalonnage.

Pour cela, une gamme d'ADN d'au moins 5 points est réalisée par dilutions successives de l'échantillon de base chargé en ADN. La détermination de l'efficacité d'une PCR permet d'évaluer sa robustesse et se calcule selon la formule : $E = 10^{(-1/\text{pente})}$

L'efficacité valide la quantification d'ADN lorsqu'elle est proche de 1. La qPCR permet donc une détection et une quantification supérieure à la PCR classique à moindre coût et diminue les risques de contamination de l'ADN. On estime sa sensibilité 100 fois supérieure à la PCR standard (77).

III.3. PCR temps réel appliquée aux helminthes

III.3.1 Prérequis à l'utilisation de la qPCR helminthes

La paroi des œufs d'helminthes est épaisse et nécessite une étape préliminaire permettant d'accéder au matériel génétique à amplifier, les étapes de congélation/décongélation, de chauffage ou de sonification montrent de bons rendements (78) mais le recours à une étape d'homogénéisation des tissus par « battement de billes » avec des billes résistantes à la dégradation montre des résultats supérieurs en sensibilité pour les techniques de biologie moléculaire (79). Les billes de céramiques sont les plus utilisées, ainsi ajoutées au prélèvement, un broyage à haute vitesse est requis pour permettre une lyse mécanique des échantillons. Les kits d'extraction commercialisés permettent ensuite une lyse enzymatique (par protéinase K) ou chimique (tampon de lyse) des échantillons.

La présence d'inhibiteurs dans les selles tels que les acides biliaires empêche l'amplification de l'ADN diminuant ainsi la sensibilité de cette technique. Il est nécessaire de bien choisir sa technique d'extraction et de purification de l'ADN. L'ajout d'un contrôle interne à chaque étape d'amplification témoignera par sa présence en fin d'amplification de l'absence ou la présence d'inhibiteurs (12,80).

Enfin, de nombreux kits d'extraction avec des étapes supplémentaires d'élimination des inhibiteurs sont utilisés (13,77,81,82).

III.3.2. Intérêt de la qPCR multiplex

Depuis quelques années, il est possible de réaliser des amplifications simultanées pour différents parasites dans un même échantillon. Il s'agit en réalité d'utiliser plusieurs amorces et plusieurs sondes spécifiques à chaque séquence cible correspondant à l'ADN des parasites recherchés. Le développement de cette qPCR « multiplex » a permis un important gain de temps d'analyse sans diminuer la sensibilité de détection des parasites obtenue par qPCR monoplex (13,16).

Pour ce faire, les amorces utilisées correspondent à des séquences d'ADN ribosomiques ou des cibles touchant les sous-unités ribosomiques des helminthes d'intérêt (13,16,81,83).

L'amorce utilisée pour *Ascaris lumbricoides* a pour gène cible ITS1 correspondant à la première région de la séquence espaceur transcrit interne de l'ADN ribosomal (ADNr) et de l'ARN ribosomal (ARNr). Les taux d'ADNr de ITS-1 étant proportionnels au nombre d'œuf d'*Ascaris* embryonnés permet la mise en évidence de la viabilité des œufs. (84) Le gène cible de l'ARN 18S de *Strongyloides stercoralis* code pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique. Enfin, *Necator americanus* et *Ancylostoma duodenale* ont pour gène cible la deuxième région de la séquence de l'espaceur transcrit interne de l'ADNr (ITS2) permettant une différenciation de ces deux espèces.

Ces quatre parasites sont les plus souvent ciblés lors de la mise en place de qPCR multiplex mais sont parfois regroupés avec d'autres parasites tels que *Trichuris trichiura* (85) ou même des protozoaires tels que *Giardia lamblia* ou *Entamoeba histolytica* (86).

L'avantage de ces techniques repose particulièrement sur la flexibilité des combinaisons de parasites à diagnostiquer, ces systèmes dits ouverts permettent de contrôler les modalités d'extraction et d'amplification.

Depuis avril 2019, le kit commercial ALLPLEX GI HELMINTHES d'EurobioScientific a été commercialisé dans le cadre du diagnostic de neuf helminthes : *Strongyloides spp*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris spp*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis spp*, *Taenia spp* et *Enterocytozoon spp/Encephalitozoon spp*. Il s'agit du premier kit commercialisé pour l'extraction d'ADN d'helminthes dans les selles, confirmant l'importance de la place prise par la PCR dans le domaine microbiologique. Ce kit a pour avantage sa simplicité d'utilisation et sa rapidité ainsi que l'exhaustivité des parasites étudiés. Cependant, le coût est significativement plus élevé que les PCR « maison » et cette technique a l'inconvénient de se présenter comme un système fermé non modulable par le biologiste.

Actuellement, est en cours d'évaluation le test Novodiag[®] Stool Parasites. C'est une solution de diagnostic entièrement automatisée, rapide (résultats obtenus en environ 90 min) et facile d'utilisation. Ce test syndromique allie les technologies de PCR en temps réel et de puces à ADN pour permettre une analyse rapide et complète de plus de 95 % des parasites intestinaux helminthes, protozoaires et microsporidies.

PARTIE B : MISE EN PLACE ET EVALUATION D'UNE PCR MULTIPLEX EN TEMPS REEL DES PRINCIPALES HELMINTHIASES EN GUYANE FRANÇAISE

I. Introduction et objectifs de l'étude

Le Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie (LHUPM) du CHAR est le seul laboratoire universitaire du territoire spécialisé dans le diagnostic des infections fongiques et parasitaires. Si le diagnostic des parasitoses intestinales pose peu de soucis techniques au niveau des structures de santé du littoral, il n'en est rien pour celles situées à l'intérieur de la Guyane et plus précisément celles en zones isolées. La majorité des CDPS à l'exception d'Apatou, Grand-Santi qui relèvent sur le plan médical du CHOG acheminent leurs prélèvements jusqu'à l'hôpital de Cayenne.

La biologie délocalisée impliquant des automates est en « phase test » sur 5 sites pilotes (Saint-Georges, Régina, Cacao, Maripasoula et Grand Santi). La majorité des CDPS utilisent des TROD (test rapide d'orientation diagnostic) pour le dépistage du VIH, de la dengue, du streptocoque du groupe A. Des tests de diagnostics rapides (TDR) comme le TDR paludisme, norovirus, rotavirus sont utilisés quotidiennement dans les CDPS, les accréditations selon la norme ISO 15189 sont en cours.

L'essentiel des demandes de biologie provient via le circuit de transfert sur le CHAR ou le CHOG à savoir :

- Prélèvements par le personnel infirmier du centre selon les recommandations du catalogue et manuel de prélèvement des laboratoires ;
- Acheminement utilisant la logistique mise en place par la coordination des CDPS (glacière,...) : délai selon le centre entre quelques heures (trajet routier voire avion + route) à quelques jours (pirogue + route) ;
- Réception, tri, déballage et enregistrement au niveau des laboratoires respectifs.

Ces conditions de transport imposées par la configuration géographique et structurelle de la Guyane ne sont pas optimales pour l'application de méthodes classiques de diagnostic des parasitoses recherchées. C'est pour cela que peu de prélèvements de selles sont effectués dans les CDPS et peu de diagnostic de certitude sont posés sur les populations des fleuves. « En alternative », des traitements préemptifs sont attribués lors de manifestations cliniques pouvant évoquer une étiologie parasitaire sans que le diagnostic de certitude ne soit posé.

Face à la situation épidémiologique et structurelle de la Guyane (voir chapitre II.A.2), la mise à disposition d'un outil tel qu'une technique de qPCR multiplex couvrant les helminthiases les plus fréquentes de cette région, réalisable à distance du prélèvement, semble être une alternative intéressante à proposer dans le cadre des diagnostics des infections des parasitoses intestinales. Cet outil permettra aussi l'évaluation dynamique de l'épidémiologie de ces parasitoses.

La validation de la méthode selon la norme ISO 15189 définit la nécessité d'évaluer les critères de performances de la méthode : répétabilité, contamination inter-échantillon, fidélité intermédiaire, limite de détection et reproductibilité inter-laboratoire afin de valider la technique en portée B dans ce contexte. Cette étude s'inscrit dans une étape préliminaire à ce travail de validation de méthode avec une validation technique par étude de corrélation entre les résultats au laboratoire du CHAR de la microscopie optique et de la qPCR multiplex. Dans cette partie, nous présentons la mise en place de la qPCR via une analyse de corrélation avec l'examen classique de parasitologie des selles dans le cadre de l'acheminement habituel des prélèvements au laboratoire.

II. Mise en place de la qPCR multiplexe à visée du diagnostic des helminthiases

II.1. Choix de la méthode qPCR

Nous avons utilisé une qPCR multiplex avec les amorces et sondes décrites dans l'article de *Basuni et al.* de 2011 (16). Le choix de cette technique a porté sur ses performances techniques avec une sensibilité de 67,3 % et une spécificité de 100 % (11,12) et sur son adéquation à répondre à nos besoins, les quatre espèces d'helminthes détectées étant les plus fréquemment retrouvées dans la région guyanaise.

Sa sensibilité a été définie avec une détection de 10 copies pour *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* et *Strongyloides stercoralis* et de 10^3 copies pour *Necator americanus*.

II.2. Technique d'extraction

Pour procéder à l'extraction d'ADN des échantillons de selles, nous avons utilisé l'automate QIASymphonySP/AS (Qiagen®) (annexe 4) avec le kit DNA tissue de QIAGEN® utilisable pour de grands volumes d'échantillons. Il s'agit d'une technique automatisable utilisant le principe des billes magnétiques et présentant un bon rendement : il est possible d'extraire un nombre important de selles en un temps très court comparativement à la technique d'extraction manuelle Power fecal DNA isolation Kit (Mobio®). Celle-ci utilise une technique de purification par membrane de silice considérée comme technique de référence. Les caractéristiques respectives de ces deux techniques sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Comparaison des deux méthodes d'extraction QIASymphony SP/AS (Qiagen®) et Power fecal DNA isolation Kit (Mobio®)

Kit commercial	Fabricant	Méthode	Quantité de départ	Protocole automatisé	Volume d'élution	Temps de préparation	Durée d'extraction	Nombre d'échantillons par run
QIASymphony SP/AS	Qiagen®	Billes magnétiques	0.25 g	oui	100µL	1h pour 24 échantillons	90 min pour 24 échantillons	24-96
Power fecal DNA isolation Kit	Mobio®	Membrane de silice	0.25 g	non (manuel)	100µL	10 min pour 8 échantillons	2 heures pour 8 échantillons	1-8

Prétraitement des échantillons

Ce protocole d'extraction nécessite un pré-traitement manuel préalable permettant une lyse mécanique des éléments cellulaires contenus dans les échantillons : œufs, larves et adultes de parasites. Après décongélation ou sur selles fraîches, une noisette de selles préalablement homogénéisée est transvasée dans un tube de 2mL contenant des billes de céramique 1.4mm Rnase/Dnases free. Ce tube est ensuite vortexé pendant une durée de 10 minutes. Les échantillons lysés et homogénéisés sont alors centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant de l'échantillon est isolé à l'aide d'une pipette Pasteur et incorporé dans l'automate pour effectuer la phase d'extraction automatisée d'une durée de 90 minutes pour un portoir de 24 échantillons. L'ADN purifié ainsi obtenu peut être conservé à une température de 2 à 8 °C pendant une durée maximale de 5 jours. Le fabricant préconise une température de -20 °C ou de -80°C pour un stockage à long terme.

Principe de la technique

Le kit d'extraction d'ADN circulant QIASymphony DNA tissue (QIAGEN) repose sur une technologie d'isolement et de purification automatisées de l'ADN grâce à la présence de billes magnétiques recouvertes de silice. Les caractéristiques de performance n'ont pas été établies pour les selles et doivent être, selon le fabricant, validées par l'utilisateur. La technologie à base de particules de silice permet la purification des acides nucléiques caractérisée par l'absence de protéines, de nucléases et de toute impureté. Les ADNs purifiés récupérés sont prêts à l'emploi pour l'amplification.

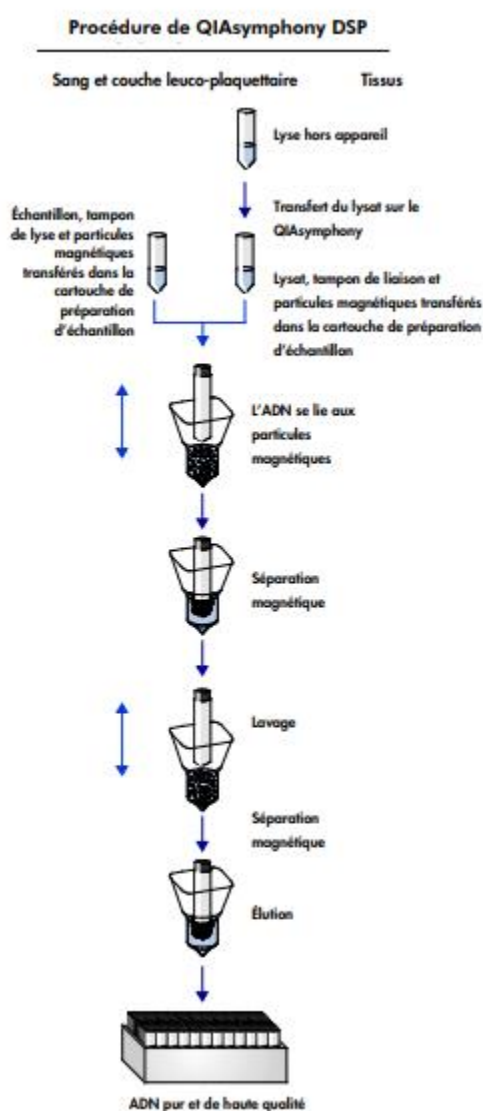


Figure 18 : schéma du principe d'extraction d'ADN par le QIASymphony (QIAGEN®)

Témoin d'extraction IPC

Afin de tester l'absence ou la présence d'inhibiteurs de PCR, nous avons ajouté comme contrôle interne l'Exo IPC (TaqMan[®] Exogenous Internal Positive Control (AppliedBiosystems[™])) lors de l'amplification de l'ADN. L'Exo IPC consiste en une matrice d'ADN unique non retrouvée dans les échantillons testés, celui-ci étant associé à une paire d'amorces et une sonde spécifiques ajoutées au mélange réactionnel. L'amplification de cette matrice doit présenter des valeurs de Ct similaires dans tous les échantillons et contrôles, détectant la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon s'il présente un Ct supérieur ou inexistant. Ce contrôle interne permet d'évaluer la fiabilité de la quantification d'ADN multiplexé et de prédire le succès de la réaction d'amplification.

II.3. Amplification d'ADN par qPCR

Dans ce travail, deux qPCR ont été « désignées » à raison d'une triplex (*Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*) et d'une biplex (*Strongyloides stercoralis* et Exo IPC). Il est nécessaire d'utiliser donc deux PCR pour chaque échantillon, le thermocycleur n'ayant pas un nombre suffisant de filtres pour effectuer une lecture sur une pentaplex. La première PCR utilise trois fluorochromes différents : TAMRA, CY5 et VIC, le quencher est un fluorochrome non fluorescent. L'autre utilise deux fluorochromes : FAM (reporteur) et un quencher non fluorescent et le contrôle IPC dont la sonde est marquée en VIC (reporteur)/TAMRA (quencher).

Sondes et amorces

Les amorces reçues déshydratées ont été réhydratées à 100 μ M et conservés à -20 °C. Les sondes ont été conservées à -20 °C. Les sondes et amorces utilisées sont celles décrites par *Basuni et al.* et montre une spécificité de 100 % (11,12).

Les différents paramètres des qPCR sont présentés dans le tableau 6 ci-dessous :

Tableau 6 : Sondes et amorces utilisées pour la qPCR multiplex helminthes.

Cible	Nom oligonucléotide	Séquences oligonucléotides	Taille en pb (paire de bases)	Gène cible
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Alum 96F	5'-GTA ATA GCA GTC GGC GGT TTC TT-3'		
	Alum 183R	5'-GCC CAA CAT GCC ACC TAT TC-3	89 pb	ITS1
	Alum 124T	TAMRA-5'-TTG GCG GAC AAT TGC ATG CGA T-3' -black hole quencher 2		
	8S-1530F	5'-GAA TTC CAA GTA AAC GTA AGT CAT TAG C-3'		
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Stro18S-1630R	5'-TGC CTC TGG ATA TTG CTC AGT TC-3'	101 pb	18S
	Stro18S-1586	Cy5-5'-ACA CAC CGG CCG TCG CTG C-3' black hole quencher 3		
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Ad125F	5'-GAA TGA CAG CAA ACT CGT TGT TG-3'		
	Ad195R	5'-ATA CTA GCC ACT GCC GAA ACG T-3'	71 pb	ITS2
	Ad155MGB	VIC-5'-ATC GTT TAC CGA CTT TAG-3' –nonfluorescent quencher		
<i>Necator americanus</i>	Na58F	5'-CTG TTT GTC GAA CGG TAC TTG C-3'		
	Na158R	5'-ATA ACA GCG TGC ACA TGT TGC-3'		
	Na81MGB	FAM-5'-CTG TAC TAC GCA TTG TAT AC-3' -non fluorescent quencher	69 pb	ITS2

Thermocycleur

Nous avons utilisé le thermocycleur Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (AB 7500) distribué par Thermo Fisher Scientific® (annexe 5). Ce thermocycleur permet l'analyse simultanée de 96 échantillons. Il comporte un système optique constitué d'une lampe au xénon permettant l'excitation des fluorochromes et ainsi la détection de la fluorescence. Le programme d'amplification du Thermocycleur Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems est résumé dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Programme d'amplification du Thermocycleur Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems.

	Température	Durée	Cycle
L'activation du système Uracyl-DNA-glycosylase permettant la dégradation d'amplicons contaminants	50 °C	2 min	1
Dénaturation initiale	95 °C	10 min	1
Dénaturation	95 °C	15 s	40
Hybridation / amplification	60 °C	1 min/kb	

Mélange réactionnel

Le volume de chaque réactif est préparé à chaque série, adapté au nombre d'échantillons à étudier, témoins positifs et négatifs inclus. Le mélange réactionnel comprend les amorces et sondes spécifiques, un kit de Mastermix PCR de Thermofisher® contenant les 4 désoxyribonucléotides (A, G, C, U), une Taq polymérase, MgCl₂, du tampon 2X. Les réactions de qPCR ont été effectuées dans un volume final de 50 µl contenant 1×TaqMan® Gene Expression Master Mix avec Uracyl-DNA-glycosylase (Applied Biosystems™), 0,9 µM de chaque amorce, 0,25 µM de la sonde, 10 µl de matrice d'ADN ainsi que 6 µl de TaqMan® Exogenous Internal Positive Control (Exo IPC) (Applied Biosystems™). Le volume final dans chaque puits étant de

50 µL comprenant 40 de mélange réactionnel et 10 d'ADN (Voir annexe 6 et 7 : mélange réactionnel).

Afin de valider l'amplification, un contrôle négatif a été ajouté à chaque run. Tous les échantillons cliniques ont été passés en double (duplicate) afin de s'affranchir de la répartition aléatoire des parasites dans les selles, la valeur du Ct retenue étant la moyenne des deux réplicats si ceux-ci se trouvent positifs.

III. Comparaison des méthodes qPCR versus microscopie optique : témoins, échantillons et échantillonnage

III.1. Techniques classiques microscopiques de parasitologie des selles

Au laboratoire du CHAR, l'examen parasitologique des selles s'effectue par examen direct puis par techniques d'enrichissements : Bailenger pour la recherche des protozoaires et des helminthes, technique de Kato-Katz pour la recherche d'œufs d'helminthes et technique de Baermann pour la recherche d'anguillule. Ces techniques sont développées dans le chapitre A.II.I.1. « Examen microscopique des selles ».

III.2. Echantillons et échantillonnage

III.2.1. Collecte des échantillons pour étude de corrélation

Les échantillons sélectionnés pour cette étude de comparaison de méthode proviennent de selles reçues et analysées au LHUPM du CHAR entre avril 2017 et juillet 2018 ; Celles-ci ont été sélectionnées afin d'obtenir un panel d'échantillons représentatifs des prélèvements positifs et négatifs englobant ainsi les quatre espèces d'helminthes concernées. Les résultats sont obtenus par microscopie optique, technique considérée comme gold standard. Ces prélèvements ont suivi le circuit pré-analytique du LHUPM avec un conditionnement dans des pots à coproculture (bouchon rouge à large ouverture), avec une identification par étiquetage sur les pots accompagnés d'un bon de demande identifiant le patient, le service demandeur, le préleveur, le prescripteur et l'heure de prélèvement.

III.2.1.1 Echantillonnage avec congélation à J0 de l'analyse microscopique

Pour tous ces échantillons, les selles ont été observées au microscope selon les techniques état frais, concentration par Baermann, Kato-Katz et Baermann. Par la suite, elles ont été conservées au réfrigérateur (+4 °C) avant d'être aliquotées et congelées en fin de journée à -20 °C.

Nous avons sélectionné 46 échantillons répartis en 43 selles et 3 liquides duodénaux ; pour détecter d'éventuelles réactions croisées entre les parasites, nous avons étudié différentes coinfections :

- 23 échantillons positifs pour le genre *Ancylostomidae* dont quatre coinfections : deux avec *Strongyloides stercoralis*, une avec un protozoaire type *Giardia intestinalis* et une autre avec le nématode *Trichuris trichiura*.
- 11 échantillons positifs pour *Strongyloides stercoralis* dont deux coinfections avec ankylostomes, deux coinfections avec le protozoaire *Giardia intestinalis* et une avec *Chillomastix mesnii*.
- 2 échantillons positifs pour *Ascaris lumbricoides* dont une coinfection avec *Giardia intestinalis*.
- 12 échantillons ne présentant pas d'helminthiase par microscopie : trois retrouvant des infections à *Giardia intestinalis*, deux à *Cryptosporidium*, un à *Chillomastix mesnii*, un à *Entamoeba histolytica* et cinq échantillons ne présentant aucune parasitose intestinale.

III.2.1.2. Échantillonnage avec différents temps de congélation

Afin de maîtriser les contraintes dues au délai d'acheminement des prélèvements, nous avons effectué une étude sur l'impact du délai de congélation des selles après réception sur les résultats en qPCR. Nous avons sélectionné quatre échantillons dont les résultats établis par microscopie correspondent aux quatre parasites étudiés.

Pour chaque échantillon reçu, nous avons aliquoté et congelé à -20 °C les selles le jour même (J0), à 24 h (J1), 48 h (J2), 72 h (J3), ainsi qu'à 7 jours (J7) après réception du prélèvement. Nous avons réalisé les qPCR sur chaque aliquot.

III.2.2 Production de témoins positifs

Les témoins positifs du groupe Ancylostomidés et du parasite *Ascaris lumbricoïdes* sont été obtenu par isolement de vers adultes identifiés sur des critères morphologiques par microscopie et présents en quantité abondante dans des liquides duodénaux ou dans des selles reçus au laboratoire du CHAR. Ces adultes ont ensuite été cryobroyés à l'aide de mortier et pilon en porcelaine résistants aux basses températures de l'azote liquide. Dans le cas de *Strongyloides stercoralis*, une étape de mise en culture des larves récoltées dans les selles précède le cryobroyage des adultes. Ces broyats ont ensuite été conservés à -20°C.

IV. Résultats de l'analyse de corrélation entre les deux techniques.

Sur les 46 échantillons sélectionnés pour de cette corrélation de méthode, nous avons obtenu 38 concordances et 8 discordances.

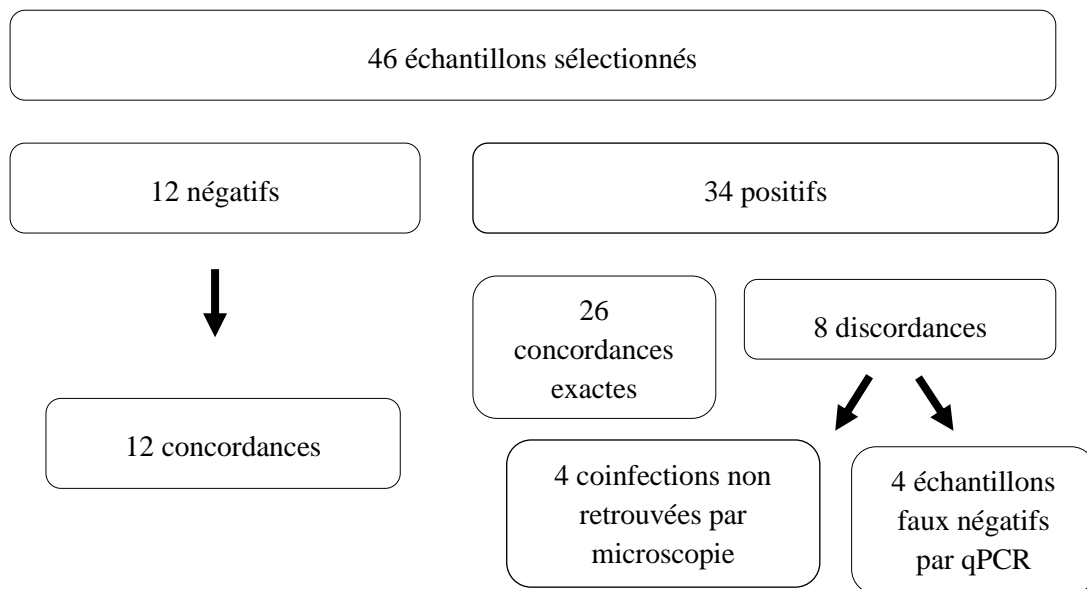


Figure 19 : Description de la corrélation de méthode sur les échantillons du laboratoire (n=46).

Les douze échantillons ne présentant pas d'helminthes par microscopie sont retrouvés négatifs en biologie moléculaire.

Sur les 34 échantillons positifs sélectionnés par microscopie, nous avons retrouvé 8 discordances avec la PCR en temps réel :

- Trois échantillons retrouvant un monoparasitisme à ankylostomes en microscopie ont montré des coinfections par qPCR avec présence de *Strongyloides stercoralis*.
- Trois échantillons retrouvant de rares œufs d'ankylostomes par technique de concentration Kato-Katz en microscopie ne sont pas retrouvés positifs par qPCR.

- Un échantillon positif pour *Strongyloides stercoralis* par technique de Baermann (non retrouvé par technique état frais et concentration) est retrouvé négatif en qPCR.
- Sur les six échantillons étudiés présentant une rare quantité d'œufs d'ankylostomes au Kato-Katz seulement trois, soit 50%, ont été détectés par qPCR. Les résultats retrouvés par microscopie et par qPCR sont décrits dans le tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8 : Comparaison des résultats des techniques classiques de parasitologie de selles et de la qPCR multiplex échantillonnage de 46 selles de patients.

Parasites	Microscopie (n=46)	PCR temps réel multiplex (n=46)
monoparasitisme		
Ankylostomes :		
- <i>Necator americanus</i>	20	11*
- <i>Ancylostoma duodenale</i>		1
- <i>Ascaris lumbricoides</i>	2	2
- <i>Strongyloides stercoralis</i>	10	9*
polyparasitisme		
<i>Necator americanus et Ancylostoma duodenale</i>	Non défini	2
<i>Strongyloides stercoralis et Ancylostoma duodenale</i>	1	1
<i>Strongyloides stercoralis et Necator americanus</i>		3
Négatif	13	17

* La qPCR retrouve un nombre inférieur de monoparasitisme à *Necator americanus* et *Strongyloides stercoralis* car ces échantillons sont détectés polyparasités.

On remarque que la qPCR n'a pas détecté de parasites sur quatre échantillons (trois pour le groupe Ancylostomidés et un pour *Strongyloides stercoralis*) soit une survenue de 8 % de faux négatifs. De même, la microscopie n'a pas détecté trois échantillons positifs à *Necator americanus* en coinfection avec *Strongyloides stercoralis*, soit 6 % de faux négatifs. Ces résultats montrent une sensibilité de 89,2% et une spécificité de 100% de la qPCR.

Tableau 9 : nombre d'échantillons retrouvés positifs par parasite en technique microscopique et moléculaire sur les échantillons du laboratoire (n=46).

Parasite	Nombre d'échantillons positifs par qPCR	% d'échantillons positifs par qPCR (n=46)	Nombre d'échantillons positifs par microscopie	% d'échantillons positifs par microscopie (n=46)
<i>Ancylostomidés</i>	18	43	21	48
<i>Strongyloides stercoralis</i>	13	38	11	24
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	4	2	4

Il n'existe pas de différence significative entre les résultats retrouvés par qPCR et par microscopie (p=0,08).

Polyparasitisme

Trois cas de polyparasitisme ont été détectés par qPCR :

- Deux à *Strongyloides stercoralis*/*Necator americanus*
- Un à *Strongyloides stercoralis*/*Ancylostoma duodenale*.

Ces trois échantillons sont retrouvés monoparasités par un Ancylostomidé en microscopie malgré l'utilisation de la technique spécifique de Baermann.

On notera aussi la survenue de deux coinfections aux parasites du groupe Ancylostomidés, *N. americanus* et *A. duodenale*, non distinguables par microscopie.

Les résultats obtenus sur les échantillons du CHAR recueillis dans cette partie sont représentés dans la figure 20 ci-dessous :

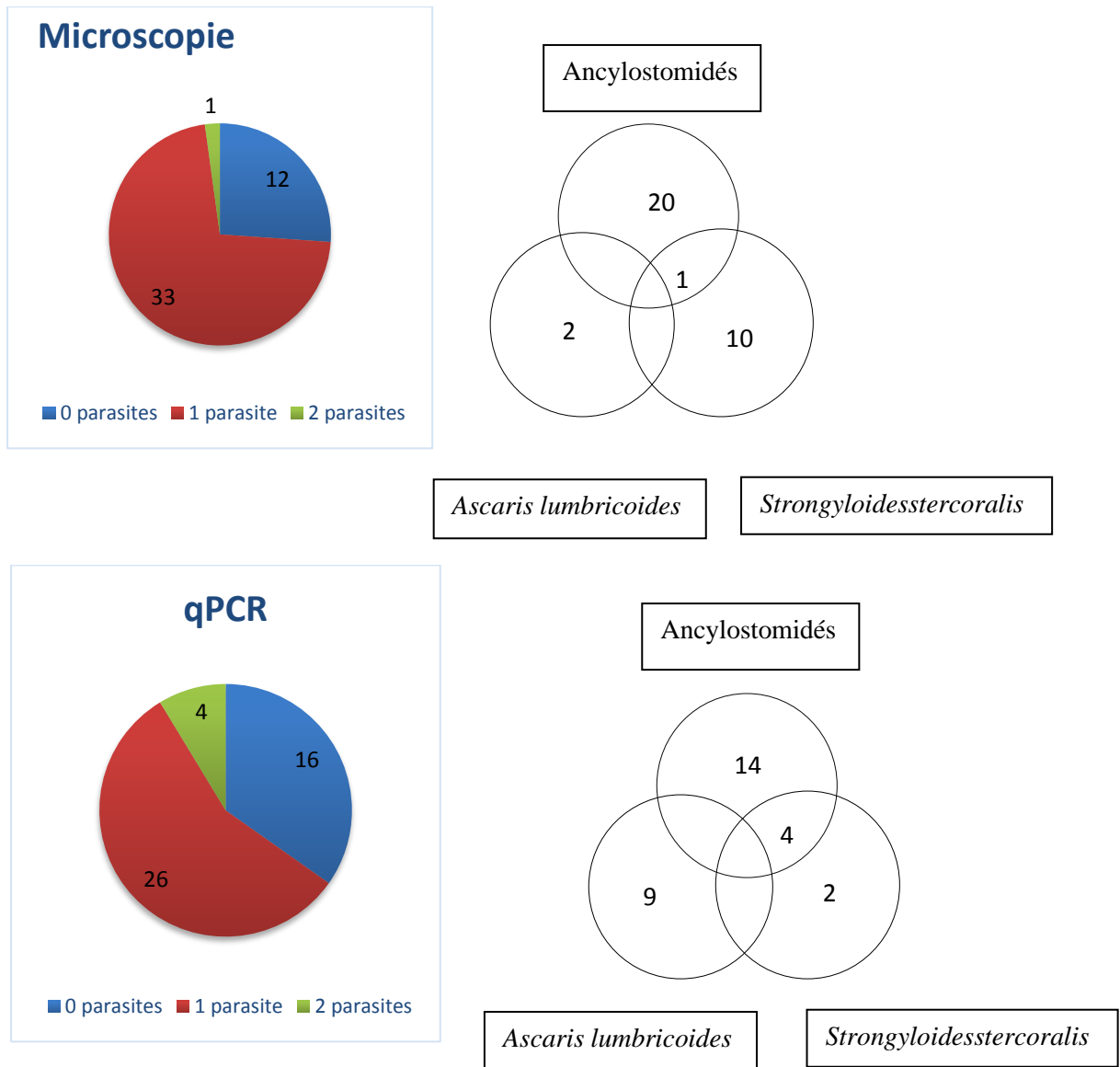


Figure 20 : Représentation graphique des résultats obtenus par microscopie et qPCR sur les échantillons collectés au laboratoire du CHAR (n=46).

La valeur médiane des Ct retrouvés par qPCR pour les échantillons positifs ou négatifs par microscopie sont résumés en annexe 8.

Délai de congélation des selles

Il s'agit de vérifier l'influence du délai de congélation sur la qPCR. On observe que le temps d'attente des échantillons au réfrigérateur avant congélation n'a pas d'influence sur la positivité de la qPCR jusqu'à 7 jours, les résultats de Ct étant non significativement différents ($p=0,98$). Les résultats sont décrits dans le tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10 : Valeurs des Ct sur des échantillons congelés à J0, J1, J2, J3 et J7 Na=*Necator americanus*, Ss=*Strongyloides stercoralis*, Al=*Ascaris lumbricoides*, Ad=*Ancylostoma duodenale*

Valeur de Ct du parasite détecté	J0	J1	J2	J3	J7
Ad	35,3	35,7	30,7	33,2	35,6
Na	29,4	30,2	25	37,7	38
Ss	33,7	33,5	35	32,7	32,9
Al	35,6	35,4	36,1	33,4	34,2

PARTIE C : APPLICATIONS D'UNE PCR MULTIPLEX EN TEMPS REEL DES PRINCIPALES HELMINTHIASES EN GUYANE FRANÇAISE

Cette partie décrit deux applications de l'usage de la qPCR, ce travail comporte une étape préliminaire de validation technique par étude de corrélation puis une évaluation de ses performances au travers d'un exemple d'application sur le terrain. Secondairement, un traitement des données épidémiologiques récoltées dans le village de Trois-Palétuviers situé en Est-Guyanais permettra l'estimation du taux de prévalence de ces quatre parasitoses intestinales sur ce territoire.

I. Application de l'usage de la qPCR dans le cadre de l'étude HELMINFAG

Ce volet de l'étude s'intéresse à une population ciblée de Guyane : les militaires affectés sur des missions de longue durée sur le territoire. Les sujets militaires ont amené leurs selles dans les Centres médicaux des armées de Cayenne et Kourou. Ces échantillons ont été acheminés jusqu'au CHAR et congelés sur place pour une réalisation extemporanée de la qPCR. La corrélation de méthodes a été entreprise sur ces échantillons afin de diagnostiquer les parasitoses intestinales dans cette population par une autre technique et ainsi de définir la place de celle-ci dans le dépistage de cette population.

I.1. Objectif de l'étude HELMINFAG

L'objectif de cette étude dirigée par le Docteur Pommier de Santi est d'évaluer la prévalence et la diversité des parasitoses intestinales chez les militaires français déployés en forêt sur des camps d'orpailleurs courant 2015. De plus, elle vise à définir la place des techniques de biologie moléculaire dans la stratégie de diagnostic de ces parasitoses.

Il s'agit d'une étude observationnelle transversale multicentrique visant à mesurer la prévalence réelle des hyperéosinophilies sanguines chez ces militaires en séjour de longue durée.

Nous avons effectué une analyse de corrélation entre les résultats obtenus par techniques microscopiques au laboratoire du CHAR et les résultats de la qPCR sur ces échantillons.

I.2. Matériel et méthodes

Les critères d'inclusion des sujets dans l'étude HELMINFAG sont d'être militaire, homme ou femme majeur, affecté en séjour de longue durée en Guyane. Les participants à l'étude doivent être affectés à un des 2 régiments suivant : 9^{ème} RIMa ou 3^{ème} REI, appartenir à une unité élémentaire constituée, compagnie ou section de combat, être déployé en forêt profonde ou sur les fleuves pendant le séjour en Guyane et être volontaire pour participer à l'étude.

Pour les 210 militaires concernés, les prélèvements ont été effectués dans les centres médicaux des armées : une numération de formule sanguine, un dosage des IgE totales, un examen parasitologique des selles (examen direct et concentration pour recherche d'œufs, kystes, parasites) et dans un second temps une étude moléculaire des échantillons par qPCR afin d'effectuer une corrélation des deux techniques. L'inclusion des sujets s'est effectuée sur 15 jours.

I.3. Résultats de la qPCR dans la cadre d'HELMINFAG

Nous avons retenu 182 échantillons présents en quantité suffisante pour effectuer une qPCR et 164 pour une comparaison des deux techniques (état frais et technique de concentration par microscopie).

Sur les 164 échantillons, la qPCR a détecté 22 échantillons positifs à *Necator americanus* dont 16 échantillons non diagnostiqués par microscopie. La microscopie a détecté neuf échantillons positifs aux parasites du groupe Ancylostomidés dont trois

non retrouvés par qPCR. La microscopie comme la biologie moléculaire retrouve *Necator americanus* comme seul helminthe dans cette étude. La microscopie a diagnostiqué un cas de giardiose et cinq prélèvements présentant des kystes de *E.histolytica/dispar*.

Au total, on considère donc 25 cas d'infection à *Necator americanus* sur les 164 échantillons étudiés.

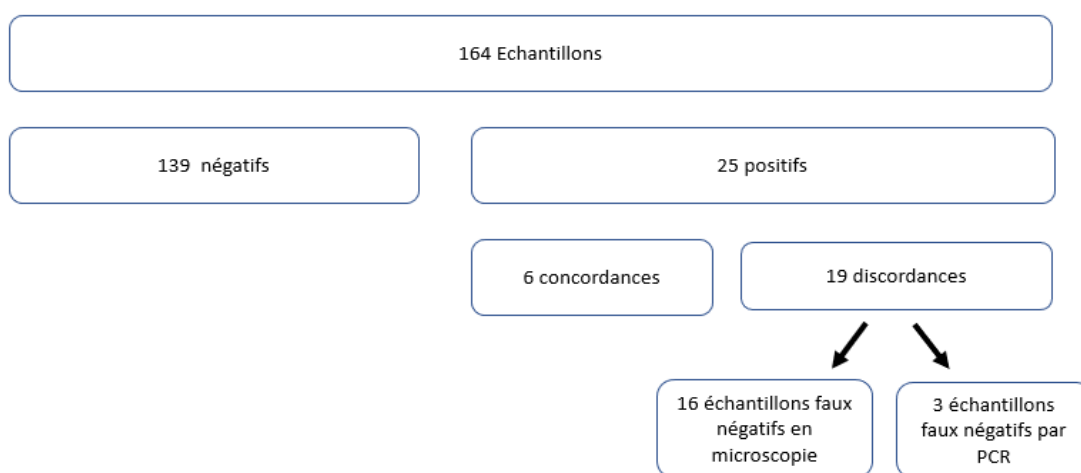


Figure 21 : Description de la corrélation de méthode sur les échantillons de l'étude HELMINFAG (n=164).

Tableau 11 : nombre d'échantillons retrouvés positifs pour *Necator americanus* en technique microscopique et moléculaire.

Parasite	Nombre d'échantillons positifs par qPCR	% d'échantillons positifs par qPCR (n=164)	Nombre d'échantillons positifs par microscopie	% d'échantillons positifs par microscopie (n=164)
<i>Necatoramericanus</i>	22	13	6	3,6

On observe que la proportion détectée par qPCR est significativement supérieure à la proportion obtenue par microscopie dans cette étude ($p=1,5.10^{-3}$) : la qPCR détecte trois fois plus de *N.americanus* que le gold standard. La sensibilité calculée pour ce parasite est de 89,2 %. L'étude de cet échantillonnage nous a permis de confirmer les résultats microscopiques montrant l'ankylostome comme seul helminthe présent dans cette population mais aussi l'absence de polyparasitisme dans les échantillons. Les valeurs médianes obtenues des Ct sont décrits en annexe 9.

II. Application dans le cadre de l'étude de Trois-Palétuviers

II.1. Contexte de l'étude PALUSTOP

Le projet PALUSTOP est un projet de recherche appliquée pour lutter contre l'épidémie de paludisme dans la zone de l'Oyapoque, dont le coordinateur est Emilie Mosnier.

Ce projet de dépistage et d'évaluation de la prévalence des accès palustres dans la commune de Saint-Georges de l'Oyapoque a vu le jour en 2017 ; L'analyse des données obtenues lors de cette première mission de terrain souligne un taux d'hyperéosinophilie non négligeable chez les habitants du village de Trois-Palétuviers : 66,1 % des habitants avaient un taux d'éosinophiles supérieur à 0,5 G/L (n=127).

Ces résultats ont conduit à mener en collaboration avec le LHUPM une étude de terrain dans le village de Trois-Palétuviers permettant d'évaluer la prévalence des parasitoses intestinales dans ce village. Ce projet s'intègre dans le plan coordonné de lutte contre les parasitoses digestives qui vise à définir une cartographie des parasitoses intestinales en Guyane française et à proposer des moyens et outils de lutte à l'échelle thérapeutique, socio-culturel, structuro-économique contre ces parasitoses.



Figure 22 : Localisation du village de Trois-Palétuviers.

Ce troisième volet de l'étude a permis de comparer nos deux techniques et d'appliquer notre outil qPCR dans le contexte particulier des zones isolées de Guyane dans des conditions d'acheminement non conventionnelles.

II.2. Matériel et méthodes

Objectifs de l'étude : Le but principal de cette mission est d'établir une prévalence instantanée initiale des parasitoses intestinales dans ce village dans l'optique d'un suivi au décours d'un traitement de déparasitage de masse.

Problématiques soulevées : la situation géographique du village de Trois-Palétuviers ne permet pas l'acheminement conventionnel des selles vers le LHUPM du CHAR. Les prélèvements doivent être acheminés jusqu'à l'hôpital de Cayenne par pirogue puis par voiture dans des glacières, la durée du voyage étant estimée à 7 heures de route. Même congelés initialement, la faisabilité et les contraintes techniques restent majeures.

Afin d'obtenir une prévalence des parasitoses intestinales dans cette population située en zone reculée de Guyane, nous avons décidé de monter un « mini-laboratoire » de diagnostic de parasitologie des selles sur site permettant un rendu immédiat des résultats de l'examen direct et du Kato-Katz avec une confirmation secondaire par la technique de qPCR multiplex au laboratoire du CHAR. Les résultats secondaires sont communiqués à l'équipe PALUSTOP pour traiter la population lors d'une de leurs missions.

Site de l'étude : le village de Trois-Palétuviers recense 186 habitants et appartient à la commune de Saint-Georges de l'Oyapoque à l'est de la Guyane. Les conditions d'aménagement du territoire et de sanitation sont préoccupantes à l'échelle du village avec captation des nappes phréatiques sur les mêmes zones que l'évacuation des eaux usées comme nous avons pu le constater en nous rendant sur place. Il n'y a pas de fosse septique, pas de traitement de l'eau entraînant un important péril fécal (9).

Cette mission de terrain a été organisée par le LHUPM en collaboration étroite avec les organisateurs du projet PALUSTOP. Il a été jugé pertinent de coupler les deux missions, permettant la mise à disposition d'une équipe de médiateurs culturels ainsi que le local de l'Office National des Forêts (ONF) situé dans le village de Trois-Palétuviers.

Déroulement de la mission : la durée de la mission était de quatre jours en équipe polydisciplinaire réduite afin de procéder à la collecte des selles suivie de leur analyse. L'équipe comprenait un médecin infectiologue, deux infirmiers, quatre médiateurs locaux et trois internes de biologie médicale. La reconstitution d'un laboratoire sur place a nécessité le transport de deux microscopes optiques, de réactifs et consommables permettant la réalisation d'un examen direct et d'une technique de Kato-Katz. Les conditions logistiques ne nous ont pas permis de réaliser de Baermann.

Collecte des échantillons de selles : la collecte des selles s'est effectuée de façon exhaustive après explication par les médiateurs culturels du projet par passage au « porte-à-porte ». Chaque famille voulant participer à l'étude a bénéficié d'un entretien personnalisé entre l'équipe médicale et le chef de famille permettant l'explication du projet et la délivrance de pots de selles pré-étiquetés pour chaque membre du foyer. Le recueil a été aléatoire, chaque membre des familles ramenant individuellement les pots. Nous avons bénéficié de la forte adhésion de la population au projet PALUSTOP. Ce projet de dépistage et d'évaluation de la prévalence des accès palustres dans la commune de Saint-Georges de l'Oyapoque s'est déroulé sur 19 mois et les inclusions ont commencé en octobre 2017. Le taux de réponse à l'étude de 2017 a été particulièrement important à Trois-Palétuviers où l'on note plus de 70 % de participation.

La notion de résidence permanente des personnes depuis au moins six mois, quelque soit leur sexe était le critère d'inclusion à l'étude. Le refus de la personne à participer à l'étude ou l'absence à son domicile au moment du passage des enquêteurs ont constitué les critères d'exclusion.

Chaque participant à l'étude a été anonymisé afin de créer une base de données. Un point GPS a été pris pour chaque foyer afin d'obtenir une répartition géographique des différents patients atteints de parasitose digestive.

Le versant épidémiologique de ce travail comprend l'estimation du nombre total de cas d'helminthiases recensés dans le village de Trois-Palétuviers : nous avons décidé de considérer tous les patients ayant bénéficié d'au moins une qPCR positive et/ou d'un examen direct et/ou d'un Kato-Katz positif pour établir la prévalence des helminthiases digestives dans ce village.

Conservation des échantillons : Les selles ont été conservées à température ambiante pendant maximum 3 heures avant d'être congelées sur place puis transportés par pirogue dans des glacières.

II.3. Résultats

Collecte des échantillons : nous avons recueilli 149 échantillons de selles dans le village de Trois-Palétuviers :

142 échantillons ont bénéficié d'un examen microscopique comprenant au minimum un état frais, 91 échantillons ont bénéficié d'un état frais et d'une technique de concentration type Kato-Katz. Cette technique de concentration n'a pu être appliquée pour 39 échantillons en raison du manque de matériel sur place.

- 138 échantillons ont bénéficié d'une qPCR au laboratoire de Cayenne.
- 8 échantillons n'ont pu bénéficier que d'une qPCR, les selles ayant été amenées trop tardivement par les patients pour procéder à une analyse microscopique sur place ; celles-ci ont donc été congelées directement afin de réaliser la qPCR de façon extemporanée.

La comparaison de méthode s'est donc effectuée sur 91 échantillons (échantillons ayant bénéficié d'un examen direct ainsi que d'une technique de concentration par microscopie puis d'une qPCR).

Sur les 91 échantillons retenus, nous avons identifié 67 échantillons présentant une concordance exacte et 23 échantillons présentant des discordances décrites selon la figure 23 :

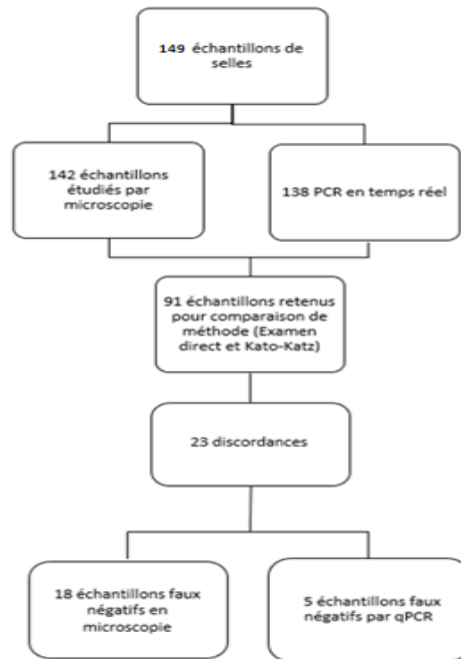


Figure 23 : Echantillons retenus pour la corrélation de méthodes chez les échantillons de Trois palétuviers.

Sur ces 23 discordances, 18 présentaient au moins un parasite non détecté par microscopie et détecté par qPCR : 4 se sont révélés positifs pour *Ascaris lumbricoides*, 4 pour le parasite *Strongyloides stercoralis* et 10 pour le groupe des ancylostomidés (5 pour *Necator americanus* et 5 pour *Ancyostoma duodenale*).

Sur ces 10 échantillons du groupe ancylostomidés, la microscopie n'a détecté que les œufs d'*Ascaris lumbricoides* alors que la qPCR retrouve une coinfection.

En revanche, sur 5 échantillons, nous avons constaté une absence de détection de parasite par qPCR, soit 4 échantillons positifs par microscopie pour *Ascaris*

lumbricoides (dont un présentant une coinfection avec *Ancylostoma duodenale*, celle-ci détectée par qPCR) et un pour le parasite *Strongyloides stercoralis*.

Le tableau 12 montre la comparaison des résultats par microscopie et par qPCR respectivement pour les 91 échantillons de Trois-Palétuviers.

Tableau 12 : Résultats obtenus par les deux techniques (microscopie et qPCR) des échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).

Parasites	Microscopie (n=91)	PCR temps réel multiplex (n=91)
monoparasitisme		
Ankylostomes :		
<i>Necator americanus</i>	2	3
<i>Ancylostoma duodenale</i>		1
<i>Ascaris lumbricoides</i>	40	33*
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	0
polyparasitisme		
<i>Ascaris lumbricoides et Ancylostoma duodenale</i>		4
<i>Ascaris lumbricoides et Necator americanus</i>		8
<i>Ascaris lumbricoides et Necator americanus et ancylostoma duodenale</i>	9	1
<i>Ascaris lumbricoides et Strongyloides stercoralis</i>	0	1
<i>Ascaris lumbricoides et Necator americanus et Strongyloides stercoralis</i>	0	2
<i>Strongyloides et Ancylostoma duodenale</i>		1
<i>Strongyloides stercoralis et Necator americanus</i>	1	1
Négatif	39	34

*Le nombre inférieur de monoparasitisme à *Ascaris lumbricoides* par qPCR s'explique par une détection de ces échantillons dans la section « polyparasitisme ».

Le récapitulatif du nombre d'échantillons retrouvés positifs par parasite par qPCR et par microscopie se trouve dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Nombre d'échantillons retrouvés positifs par microscopie et par qPCR par parasite pour les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).

Parasite	Nombre d'échantillons positifs par qPCR	% d'échantillons positifs par qPCR (n=91)	Nombre d'échantillons positifs par microscopie	% d'échantillons positifs par microscopie (n=91)
<i>Ancylostomidés</i>	23	25	12	13
<i>Strongyloides stercoralis</i>	5	6	2	2
<i>Ascaris lumbricoides</i>	49	54	49	53

Le taux de détection total entre la microscopie et la qPCR multiplex est significativement plus importante pour la qPCR ($p=0,008$). La valeur médiane des Ct trouvés par qPCR pour les échantillons positifs ou négatifs par microscopie sont résumés en annexe 10.

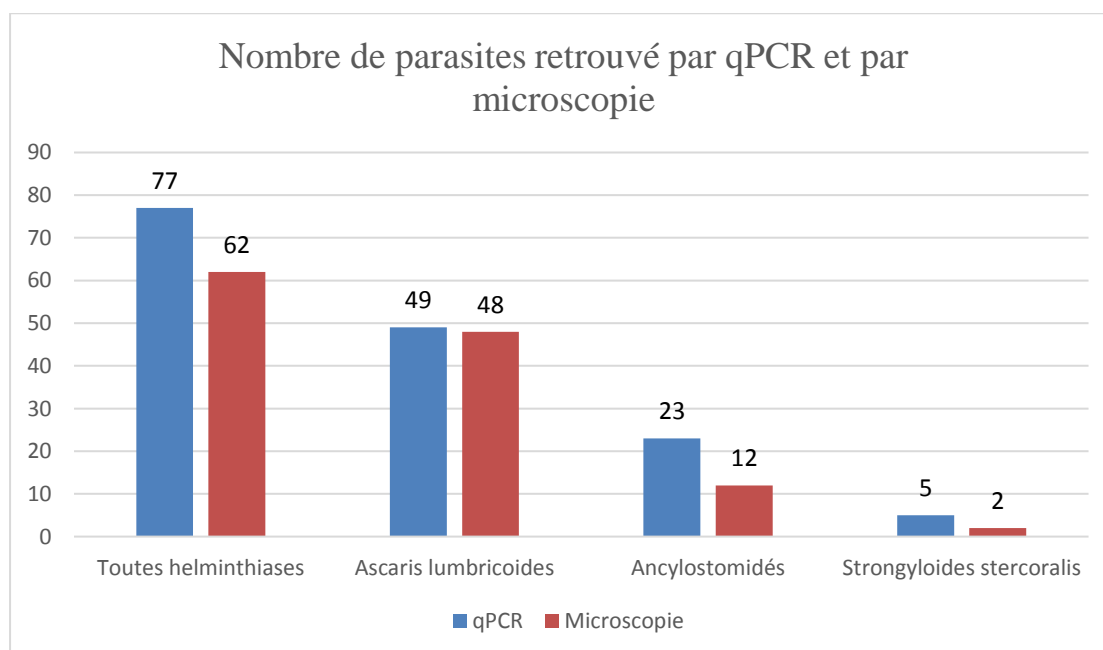


Figure 24 : Représentation graphique du nombre d'échantillons retrouvés positifs par les deux techniques par parasite.

On observe dans cette étude que la qPCR a une détection 1,2 fois supérieure (77/62) à la microscopie pour tous les helminthes. La détection est 2 fois supérieure (23/12) pour le groupe Ancylostomidés et 2,5 fois supérieure (5/2) pour *Strongyloides stercoralis*. Dans le cas de *Strongyloides stercoralis*, la détection microscopique est sous estimée par l'absence de technique de Baermann.

Polyparasitisme

On observe 42 cas de monoparasitisme par microscopie et 36 cas en qPCR car celle-ci est plus performante dans la détection de polyparasitisme. Le nombre de polyparasitisme retrouvé par qPCR est 1,8 fois supérieur à celui de la microscopie (18 cas de polyparasitisme par qPCR vs 10 pour la microscopie).

La figure 23 ci-après met en évidence les résultats obtenus par microscopie et par qPCR des polyparasitismes sur les échantillons de Trois-Palétuviers.

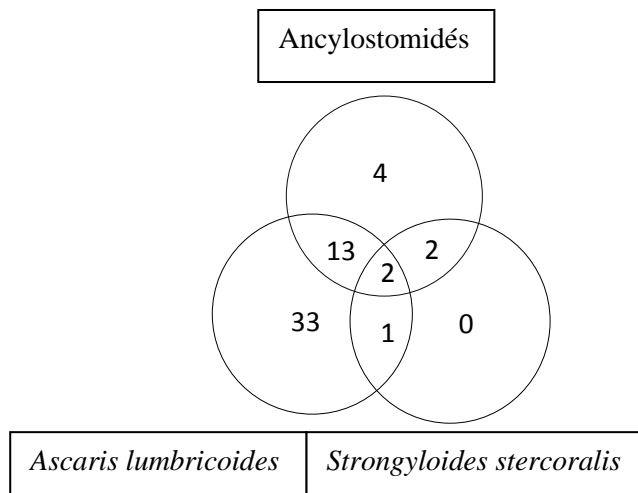
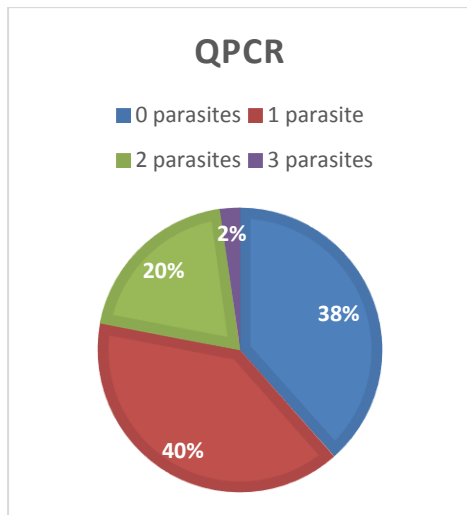
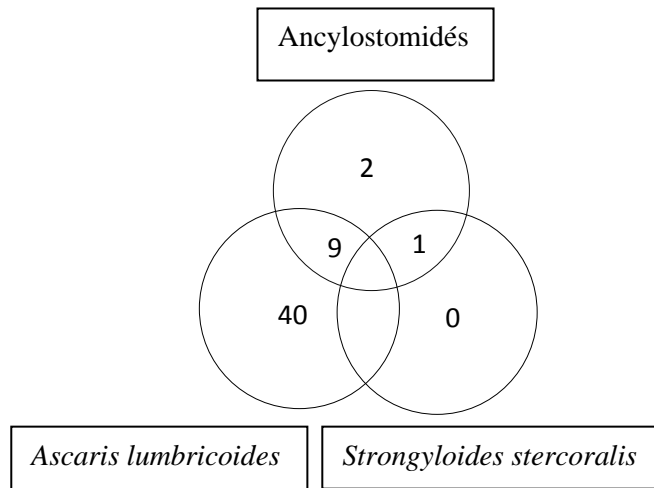
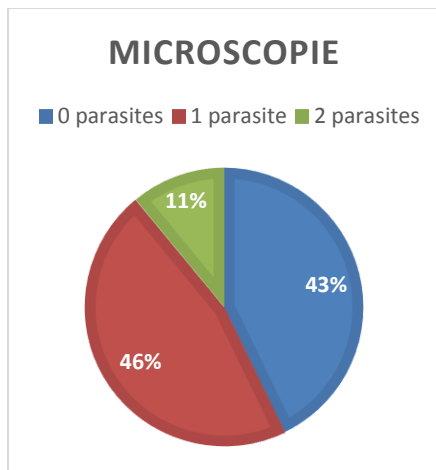


Figure 25 : Représentation graphique des résultats obtenus par microscopie et qPCR sur les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).

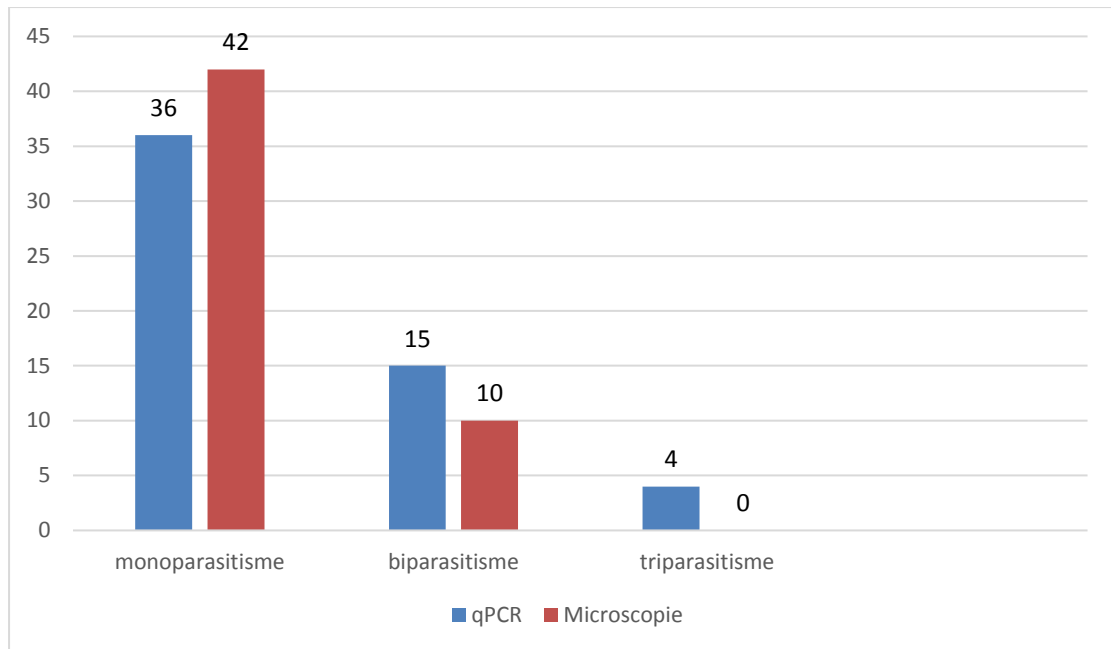


Figure 26 : Représentation graphique du nombre de mono/bi/tri/parasitisme retrouvés par microscopie et qPCR dans les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).

Analyse épidémiologique des cas recensés sur le village de Trois-Palétuviers

Au total, 149 patients ont été prélevés soit 80,1 % de la population totale de Trois-Palétuviers. L'âge des patients ayant participé à l'étude varie de 1 à 72 ans avec une moyenne d'âge de 17,7 ans [15,0-20,4] et un sexe ratio (M/F) de 1,36.

Nous obtenons une prévalence de 60,4 % (90/149) d'helminthiases, soit 90 patients présentant une contamination par au moins un helminthe. La répartition de ces infections est décrite dans la figure 27 ci-dessous :

Répartition des parasitoses intestinales des patients de l'étude dans le village de Trois-Palétuviers (n=150)

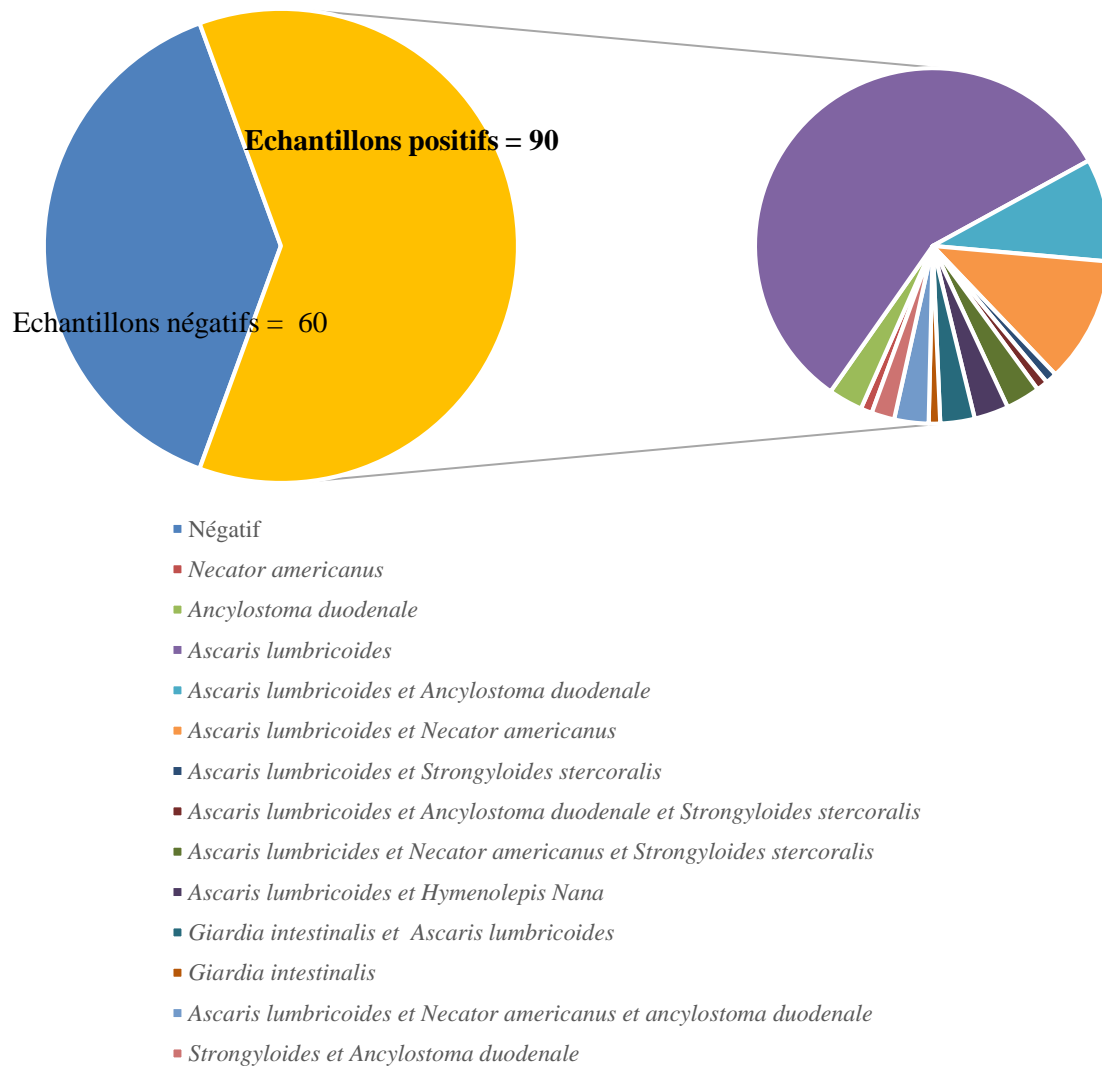


Figure 27 : Répartition des cas de parasitoses intestinales dans le village de Trois-Palétuviers.

La répartition des cas diagnostiqués des 149 patients ayant participé à l'étude de Trois-palétuviers est détaillée en annexe 11.

Sur les 149 patients prélevés, 83 (55,7%) présentent une infection à *Ascaris lumbricoides* dont 33 coinfections : 23 (69,6%) avec le groupe des Ancylostomidés (*Necator americanus* et *Ancylostoma duodenale*), 1 (3,0%) avec *Strongyloides stercoralis*, 2 (6,0%) avec *Giardia intestinalis*, 3 (9,0%) avec *Hymenolepis Nana*, 4 (12,1%) présentent un tri parasitisme avec *Strongyloides stercoralis* et un des parasites du groupe des Ancylostomidés.

Trente-trois patients (22,6%) présentent une infection par un parasite du groupe des Ancylostomidés dont 18 par *Ancylostoma duodenale*, majoritaire vis-à-vis de *Necator americanus*. Sur ces 33 patients, 29 (87,8 %) présentent des coinfections.

Six patients (4,0 %) sont infectés par *Strongyloides stercoralis*. On peut cependant considérer que ce parasite a été sous-estimé dans cette étude compte-tenu de l'absence de la technique de Baermann.

Un polyparasitisme est retrouvé chez 36 patients ce qui représente 24,2 % de la population étudiée ou 40% des patients souffrant de parasitose intestinale.

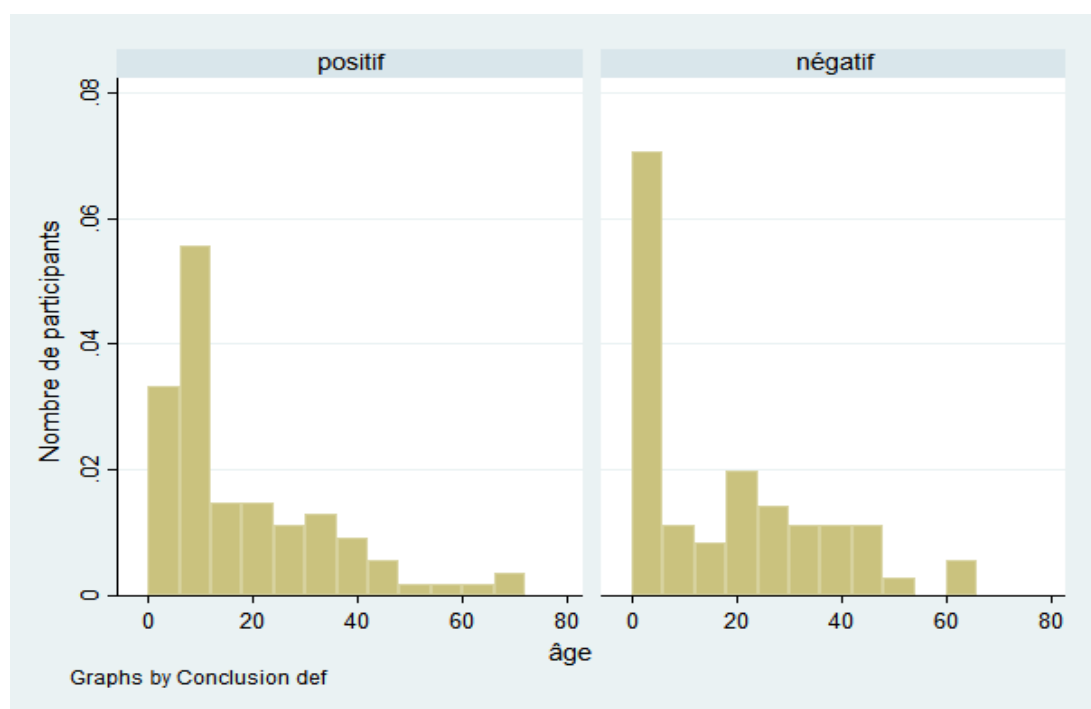


Figure 28 : Répartition des cas de parasitoses intestinales en fonction de l'âge dans la population de Trois-Palétuviers.

Les parasitoses intestinales touchent d'avantage les hommes ($p=0,017$) et les enfants de plus de cinq ans ($p= 0,03$) mais la pratique de la chasse et la pêche ne semble pas influencer sur le portage de parasitose intestinale ($p=0,919$). Enfin, les patients ayant eu accès à un traitement antiparasitaire lors des six derniers mois sont significativement moins parasités que les patients n'en ayant pas eu ($p=0,028$) (données récentes PALUSTOP *E.mosnier*). La proportion de patients présentant une hyperéosinophilie ($>5G/L$) lors de la première mission réalisée par PALUSTOP en 2017 se trouve significativement plus importante chez les patients parasités lors de notre mission ($p=0,007$).

Répartition géographique des parasites dans le village de Trois-Palétuviers :

Les données microbiologiques récoltées ont permis d'élaborer une représentation cartographique des familles atteintes selon les parasites retrouvés, le critère de positivité étant défini tel qu'au moins un membre d'une famille soit infecté par au moins un parasite. La répartition géographique des parasitoses retrouvées au sein du village de Trois-Palétuviers est décrite selon les figures 29, 30, 31, 32, 33 suivantes :

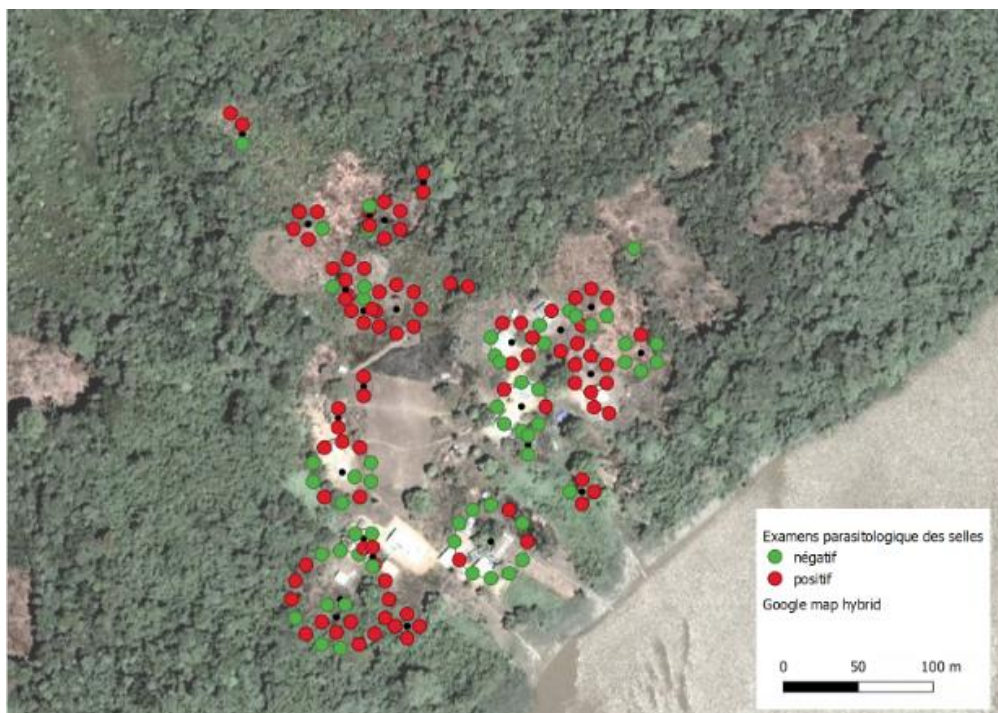


Figure 29 : Répartition géographique globale des patients parasités dans le village de Trois-Palétuviers.

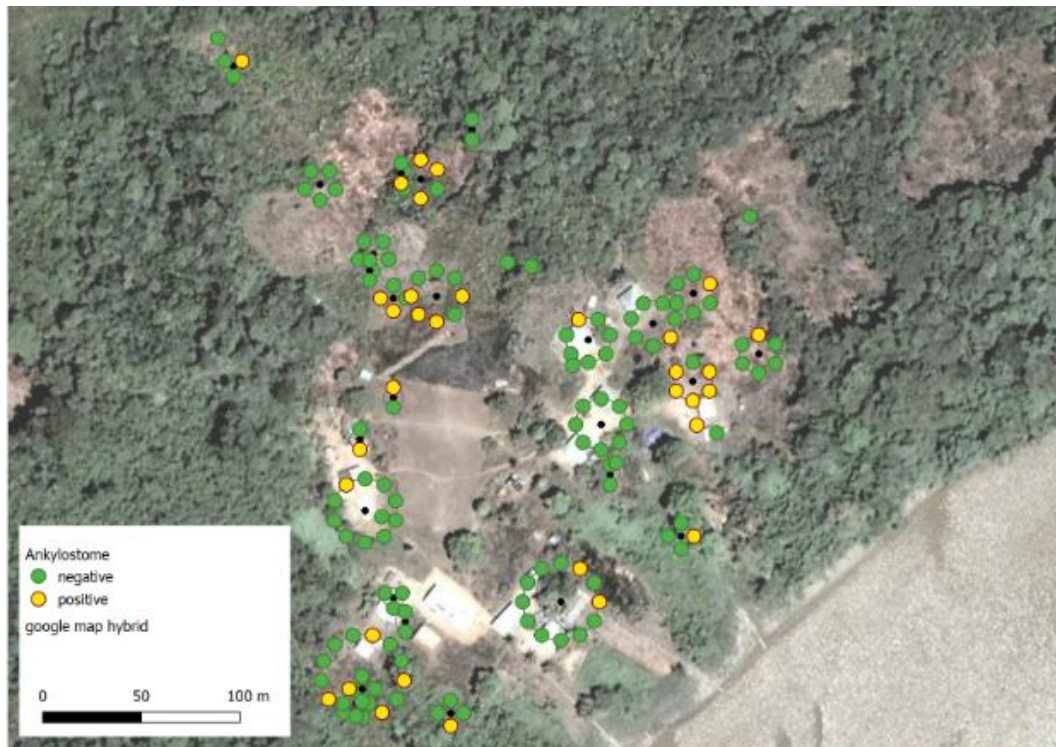


Figure 30 : Répartition géographique des patients parasités par *Necator americanus* ou *Ancylostoma duodenale* dans le village de Trois-Palétuviers.

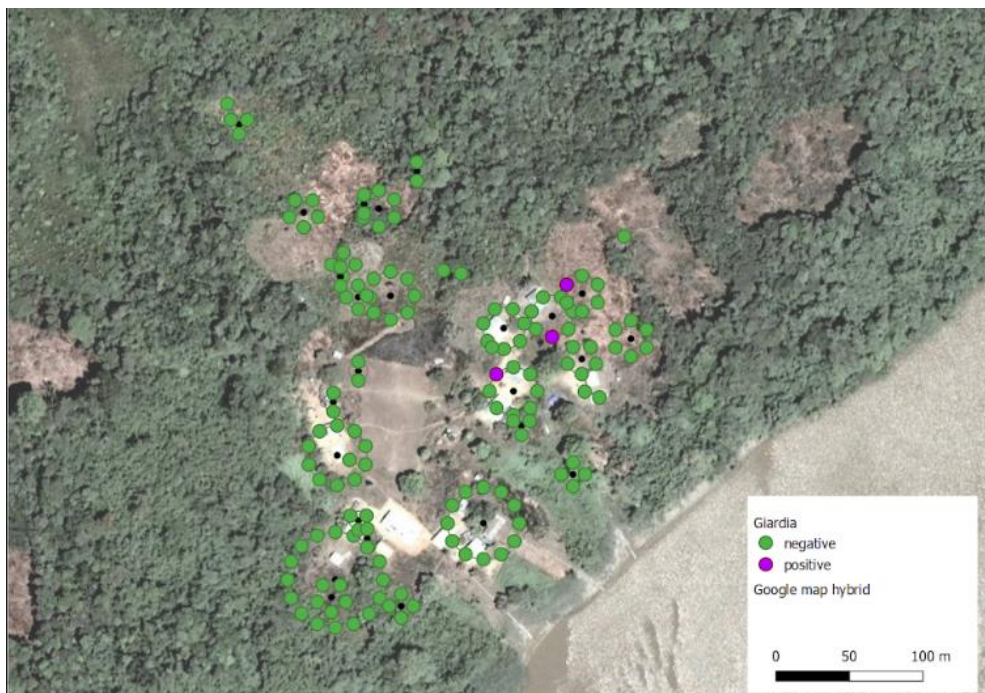


Figure 31 : Répartition géographique des patients parasités par *Giardia intestinalis* dans le village de Trois-Palétuviers.

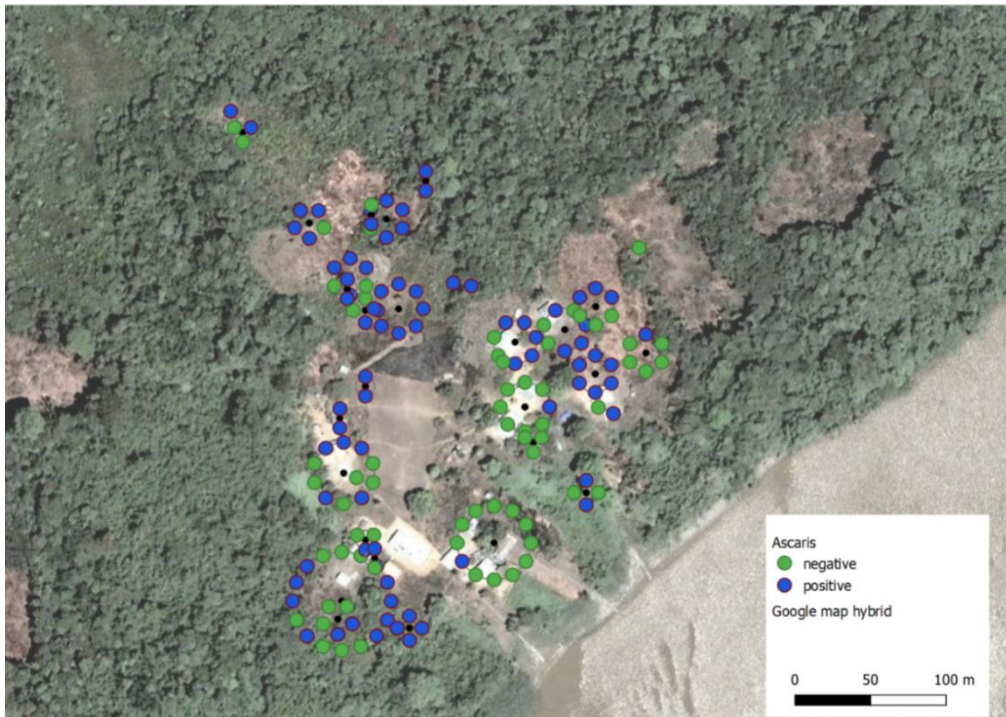


Figure 32 : Répartition géographique des patients parasités par *Ascaris lumbricoides* dans le village de Trois-Palétuviers.

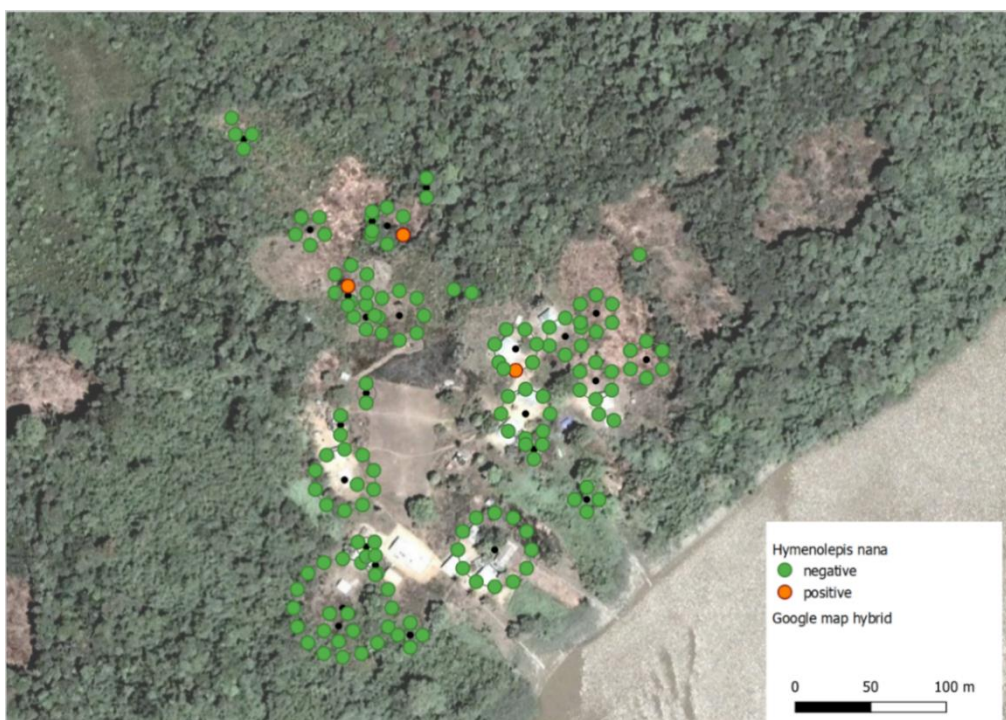


Figure 33 : Répartition géographique des patients parasités par *Hymenolepis Nana* dans le village de Trois-Palétuviers.

On observe une répartition homogène des différents parasites avec une absence de foyer de parasites dans le village expliquée par les habitudes de vie de ses habitants : la marche pieds nus est usuelle et la population fréquente les mêmes points d'eau. L'absence de bétonnage de certaines fontaines crée un environnement propice au développement des parasites dans les sols par formation de boue sous les robinets. Ce village n'a pas accès à l'eau courante par robinet individuel, chaque habitant utilise ces fontaines communes pour tout type d'utilisation (vaisselle, remplissage de bouteille, toilette des bébés,...). Une prise en charge globale de l'aménagement du territoire et des infrastructures est nécessaire pour ralentir la prolifération des parasites dans les sols.

Discussion et perspectives

Comme dans un grand nombre de régions impliquant les populations isolées dont les conditions sanitaires et sociales sont précaires (1,18), les parasitoses intestinales constituent un problème majeur de santé publique en Guyane (8,9). Pour autant, leur diagnostic reste difficile et du fait des caractéristiques cliniques peu spécifiques des parasitoses intestinales (18), le traitement pré-emptif en cas de signes compatibles (hyperéosinophilie, diarrhées et douleurs abdominales en contexte endémique) ou chimio-préventif est largement pratiqué.

L'isolement géographique de certaines zones endémiques limite le diagnostic parasitologique optimal des selles du fait de leur acheminement jusqu'au laboratoire du CHAR, qui peut passer par plusieurs modes de transport (route, aérien, pirogue). En effet, les recommandations pré-analytiques de l'examen parasitologique des selles (EPS) imposent des selles fraîches notamment pour le diagnostic des amibiases et de l'anguillulose (87). Comme pour les autres sous-spécialités en microbiologie, la qPCR est de plus en plus utilisée dans les laboratoires, grâce à son extraction automatisée et l'amélioration des performances des automates (77,88). La parasitologie qui jusque-là était une spécialité très manuelle amorce cette tendance. Notre étude qui visait à tester une qPCR multiplex « maison » sur les 4 principaux helminthiases retrouvée en Guyane française confirme les données de la littérature : la qPCR de part sa meilleure sensibilité et spécificité par rapport aux techniques classiques permet de contourner les limites de conservation, les difficultés d'acheminement de selles fraîches, les erreurs opérateur-dépendantes et permet aussi de faire face à la diminution du nombre de personnels compétents à la lecture microscopique de selles dans le domaine de la Parasitologie (16). Cet outil diagnostique, reconnu comme très sensible et spécifique dans la littérature est de même largement utilisé pour la réalisation d'études épidémiologiques à grande échelle (16,63,77,81).

Au terme de ce travail, l'évaluation des critères de sensibilité, spécificité, de corrélation devrait permettre de proposer cet outil comme alternative possible à l'EPS contournant la difficulté de l'état frais ou non de la selle.

Par ailleurs, en détectant les principaux helminthes présents sur le territoire grâce à la qPCR, une évaluation précise de la prévalence et de l'incidence des helminthiases permettra dans le cadre du plan de lutte contre les parasitoses digestives initiées en 2019 par l'ARS-GUYANE (89) de conforter les arguments du traitement de masse et de suivre l'efficacité des traitements auprès des habitants de Guyane selon les recommandations de l'OMS (37).

Le premier volet de notre étude sur les échantillons du CHAR (n=46) nous a permis de confirmer les résultats obtenus par microscopie et d'évaluer la performance de l'outil qPCR sur des échantillons acheminés de manière conventionnelle au laboratoire. La sélection d'échantillons présentant différents types de coinfections montre une efficacité comparable des deux techniques ($p=0,08$) avec une sensibilité de la qPCR de 89,2% et une spécificité de 100 %.

Le second volet de cette étude sur les échantillons des militaires du projet HELMINFAG nous a permis de confirmer la présence prédominante du parasite *Necator americanus* (15,6%) en accord avec la microscopie avec une détection 3,6 fois (22/6) plus importante par qPCR ($p=1,5.10^{-3}$). La présence majoritaire de ce parasite sur les populations fréquentant les camps d'orpillage illégaux (militaires comme orpailleurs) a été mis en évidence dans différentes études : l'étude de 2013 menée par *E.mosnier* sur l'épidémie de diarrhée aiguë chez les orpailleurs illégaux des Eaux claires constate le même phénomène avec 8 cas d'ankylostomiase chez les 12 patients hospitalisés au CHAR, de même pour les précédentes études réalisées en 2011 et 2013 chez les militaires ayant séjourné sur les camps d'orpillage illégaux (35,40). La prédominance de ce parasite dans ce contexte guyanais ne s'explique pas et nécessite des explorations supplémentaires. La promiscuité, l'hygiène précaire et l'absence de latrines sur ces camps peuvent expliquer la multiplication parasitaire des ankylostomes dans les sols (90). Au terme de cette étude, un logigramme décisionnel devrait être proposé

Le troisième volet étudie la faisabilité et la pertinence de l'application de cet outil en zone reculée avec une méthodologie semblable aux autres études dans les zones de forte endémie telle que l'étude de *Easton et al.* 2016 réalisée dans quatre villages au Kenya (77). La prévalence des parasitoses intestinales s'élève à 60,4% dans la population testée soit 48,4 % sur la population totale du village, le taux de participation de la population de Trois-Palétuviers à cette étude étant de 80,1%. Une représentation

cartographique des différents cas recensés a été réalisé permettant ainsi de proposer une analyse en rapport avec d'éventuels facteurs de risque géographiques et environnementaux. L'analyse de ce volet est en cours d'étude. Jusqu'alors, les données épidémiologiques des helminthiases digestives en Est Guyanais n'avaient été obtenues que dans les villes de Camopi et Trois-Sauts (36). Les résultats de corrélation sur cette première étude prospective dans le village de Trois-Palétuviers montrent que cet outil est performant dans les zones de fortes endémies avec une détection significativement supérieure à la microscopie concernant la détection du polyparasitisme ($p=0,01$), résultats similaires à ceux de la littérature (13,81).

Nos résultats obtenus à Trois-Palétuviers sont en accords avec les précédentes études réalisées en Guyane : les hommes se trouvent plus parasités que les femmes ($p= 0,017$) (15) bien que la chasse et la pêche ne semblent pas influencer sur le portage de parasitoses intestinales ($p=0,919$) (données récentes étude PALUSTOP, *E.Mosnier*). Cependant, nos résultats retrouvent l'*Ascaris* comme principal parasite (83%) dans ce village alors que les études réalisées à Camopi, Trois-Sauts et Antecum-Pata montrent l'ankylostome majoritaire. On remarquera toutefois que les périodes d'études sont complètement différentes avec un différentiel de plus de 10 ans, ce qui peut expliquer une différence dans les écosystèmes en rapport avec les conditions climatiques et humaines. Dans la littérature, seul le village d'Assis-Loça présente une prévalence de l'*Ascaris lumbricoides* supérieure aux parasites du groupe des ancylostomidés (35,36) (voir figure 4).

Les résultats globaux obtenus par notre étude de corrélation ($n=301$) pointent une détection supérieure des parasites par qPCR : 43,9 % (132/301) des échantillons sont positifs par qPCR pour 33,9 % (102/301) des échantillons par microscopie ($p=0,01$).

Pour chaque parasite la proportion de dépistage par qPCR est supérieure ou égale à la détection par microscopie, soit 1,6 fois (63/39) supérieure pour le groupe des Ancylostomidés ($p=0,01$), 1,3 fois (18/13) supérieure pour *Strongyloides stercoralis* ($p=0,35$) et égal pour *Ascaris lumbricoides*. Pour *Ascaris lumbricoides*, ces résultats s'expliquent par l'identification plus facile des œufs du parasite en microscopie grâce à leur nombre très important dans les selles des patients parasités (85). *Meurs et al.* avaient déjà souligné en 2017 cette absence de différence dans l'étude comparative des deux techniques pour ce parasite (91). Pour *Strongyloides stercoralis*, un nombre trop

faible d'échantillons positifs peut être une cause du manque de puissance de l'étude pour ce parasite.

Dans notre étude, les sensibilités calculées de la qPCR sont de 92,7 % pour *Ascaris lumbricoides*, 91,3 % pour le groupe des Ankylostomidés et 90% pour *Strongyloides stercoralis* avec une spécificité est de 100%. Ces paramètres concordent avec ceux de la littérature. Nous avons représenté les différentes études réalisées dans ce cadre et relativement similaires à notre étude. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Liste non exhaustive des études comparatives de sensibilité entre microscopie et qPCR publiées dans la littérature.

Référence bibliographique	Pays Population	Parasite	Sensibilité qPCR	Sensibilité microscopie	Techniques microscopiques
<i>Arndt et al 2013 (87)</i>	Kenya :	<i>A.lumbricoides</i>	85,7%	71,4%	Technique KK, formol-éther, état frais 1 selles/patient
	Patients HIV + hospitalisés	Ancylostomidés	96,9%	31,4%	
	N=153	<i>S. stercoralis</i>	83,3%	16,7%	
<i>Easton et al 2016 (76)</i>	Kenya : étude de terrain sur population de 4 villages	<i>A.lumbricoides</i>	98%	70%	Technique KK 2 selles/ patient
	N= 786	Ancylostomidés	98%	32%	
<i>Cools et al 2019 (91)</i>	Ecoliers :	<i>Ancylostomidés</i>	90%	73%	Technique KK (x2) 1 selles/patient
	Ethiopie, Tanzanie, Laos, Brésil	<i>A.lumbricoides</i>	91,9%	72,6%	

La survenue de faux négatifs par qPCR est de 4 % (12/301), proportion attendue et concordante avec les données de la littérature : 1,8 % (*Llewellyn et al. 2016*), 10% (*Meurs et al. 2017*) et 12 % (*Sanprasert et al. 2019*) (13,91,93). Dans notre étude, cette proportion est 3 fois plus importante pour la microscopie, confirmant l'efficacité supérieure de la qPCR (12,75). Ces variations observées peuvent être expliquées par les différences mineures des techniques utilisées (pré-traitement, extraction ou cycle PCR) entraînant des diminutions de performance. La mauvaise homogénéisation du prélèvement avec la dispersion des parasites dans des selles non moulées peut aussi expliquer la survenue de ces faux-négatifs (14,87,93).

Cette étude souligne la performance de la qPCR pour la détection des quatre espèces d'helminthes les plus fréquentes en Guyane. Une limite de l'étude a consisté en la sélection non aléatoire des échantillons au laboratoire du CHAR lors de la première étape de corrélation de méthode. Une sélection des échantillons « tout venant » aurait permis une représentativité de l'échantillonnage et donc d'être en cohérence avec son application dans le contexte de terrain de zones isolées. Ce travail pourrait être complété par une corrélation de méthode sur un nombre plus important d'échantillons reçus au CHAR.

L'autre limite de cette étude est la probable sous-estimation des résultats des EPS : nous n'avons pu obtenir trois échantillons selles pour un même patient comme préconisé pour un examen microscopique optimal, ce critère étant difficile à remplir dans les conditions de la Guyane. A Trois-Palétuviers nous n'avons pas eu recours à la technique spécifique de Baermann par souci logistique, ce qui sous-estime le diagnostic microscopique de l'anguillulose dans cette étude (20). Une analyse de la corrélation entre un unique résultat PCR versus les résultats de 3 examens de selles par patient permettrait de mieux ajuster le degré de sensibilité et de proposer un logigramme décisionnel en tenant compte de cette donnée.

Il aurait été intéressant d'étudier l'imputabilité des helminthes dans les hyperéosinophilies retrouvées chez les habitants de Trois-Palétuviers. Pour rappel, les données d'éosinophilies montrant la présence significative d'hyperéosinophilie ($>0,5G/L$) chez les patients parasités ($p=0,007$) étaient des données collectées lors de la première mission de PALUSTOP à Trois-Palétuviers de 2017. Sans démonstration aucune, il est à noter une corrélation entre cette forte hyperéosinophilie et la forte prévalence d'helminthes.

Notre outil qPCR ne permet pas le diagnostic d'autres parasitoses tels que le protozoaire *Giardia intestinalis*, troisième parasite le plus fréquent lors de l'étude des échantillons du CHAR entre 2011 et 2016 après les parasites du groupe des Ancylostomidés et *S. stercoralis* (15). Il en est de même, pour le parasite *Trichuris trichiura* retrouvé en petite proportion dans les études menées sur le terrain à Assis-Loça (7,7 %) et Trois-Sauts (1,8 %) (15,36). L'utilisation de tests de diagnostic rapide (TDR) pour les protozoaires comme ImmunoCard STAT de Meridian Bioscience® détectant *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* et *Cryptosporidium sp.* serait adaptée aux études de terrain et

complèterait notre panel de diagnostic. L'utilisation de TDR ou d'une autre qPCR multiplex n'a pas été entrepris dans cette étude.

Une étude de corrélation entre la quantité d'œufs par comptage microscopique et la valeur des Ct aurait permis de positionner l'outil PCR dans le suivi post-thérapeutique, le dépistage des rechutes et les résistances au traitement (49,85), ce qui n'a pas été mis en place dans notre étude. De même, l'étape d'extraction étant primordiale pour l'utilisation de la qPCR, une comparaison des performances de différentes techniques d'extraction doit être envisagé pour améliorer cette étude (94). La validation de notre méthode selon la norme ISO 1589 nécessite l'évaluation des critères de performance de la méthode : répétabilité, contamination inter-échantillon, fidélité intermédiaire, limite de détection et reproductibilité inter-laboratoire que nous devons mettre en place au laboratoire du CHAR. Enfin, la qPCR dans le diagnostic des helminthiases n'est pas standardisée, et si l'utilisation de contrôles internes positifs et négatifs à chaque run de qPCR participent au processus de contrôle de la qualité de la technique et sont disponibles dans le commerce, un système de contrôle objectif par une évaluation externe de qualité (EEQ) fait actuellement défaut ; une étude menée par *Cools et al.* 2017 a permis de mettre au point ce type de contrôle toujours au stade de recherche (95).

Dans le cadre de la Guyane, notre outil qPCR trouve son intérêt dans la distinction des deux espèces d'ankylostomes qui est impossible par simple observation des œufs par microscopie. Ces données permettent de mieux apprécier la répartition de ce groupe de parasites sur le territoire et d'appréhender les implications cliniques spécifiques à ces deux espèces, par exemple *Ancylostoma duodenale* provoque des anémies deux à 10 fois plus importante que *Necator americanus* (96) ; on observe d'ailleurs dans notre étude une proportion plus importante d'infection par *Ancylostoma duodenale*. *A contrario*, une étude menée en 1994 par *Jozefzoon et al.* au Suriname montre l'absence de ce parasite sur les 804 échantillons testés alors qu'une prévalence de 40% était observée pour le parasite *Necator americanus* (7).

L'OMS considère que les résultats des études de prévalence d'une zone peuvent être étendus à toute les zones écologiquement homogènes sur un même territoire. (voir définition annexe 12) (37). Cependant, nos résultats montrent que la répartition des parasites intestinaux varie selon les territoires d'étude en Guyane comme le montrent

nos données et celles de la littérature (figure 4). L'étude à Trois-Palétuviers permet d'illustrer par la cartographie des foyers parasités la prévalence initiale des parasitoses intestinales dans cette population. Cette carte servira de référence pour l'évaluation dynamique des cas de parasitoses intestinales dans ce village lors de prochaines missions. La mise en évidence des facteurs de risques associés aux habitudes de vie des familles parasitées pourrait faire l'objet d'une nouvelle étude.

Dans le contexte de la Guyane, cet outil trouverait sa place dans le diagnostic des parasitoses intestinales chez différentes populations :

- Dans le cadre du dépistage des parasitoses intestinales chez les militaires en mission longue en Guyane, l'une des applications de cet outil serait la recherche ciblée des helminthiases compte-tenu de l'épidémiologie particulière des parasites intestinaux chez les militaires présentant un taux d'éosinophilie élevé après des missions réalisées dans le cadre de la lutte contre l'orpillage illégal sur le territoire. La prévalence de 15,2% de STH dans l'étude HELMINFAG ne permet pas de proposer un traitement préventif à cette population selon l'OMS (1).
- Cet outil diagnostique trouve aussi sa place dans le cadre du plan de lutte contre les parasitoses digestives mené par l'ARS-Guyane. Son application principale dans les zones reculées de Guyane permettrait d'obtenir des prévalences précises par région pour les différentes populations du territoire ; l'OMS préconise l'utilisation de la prévalence comme seul outil d'estimation des parasitoses intestinales (41). De nouvelles missions de collectes de selles dans les villages de l'Ouest et de l'Est Guyanais permettraient d'effectuer le diagnostic des parasitoses par qPCR au laboratoire du CHAR et ainsi établir une prévalence initiale des parasitoses dans différentes communes avant toute chimioprévention. Selon les recommandations de l'OMS, lorsque la prévalence des STH d'une population se situe entre 20 et 50%, un traitement chimiopréventif doit être proposé aux populations une fois par an avant d'effectuer une nouvelle étude de prévalence cinq à six ans après ces mesures. Il faut cependant que cette prise en charge fasse partie d'un plan globale

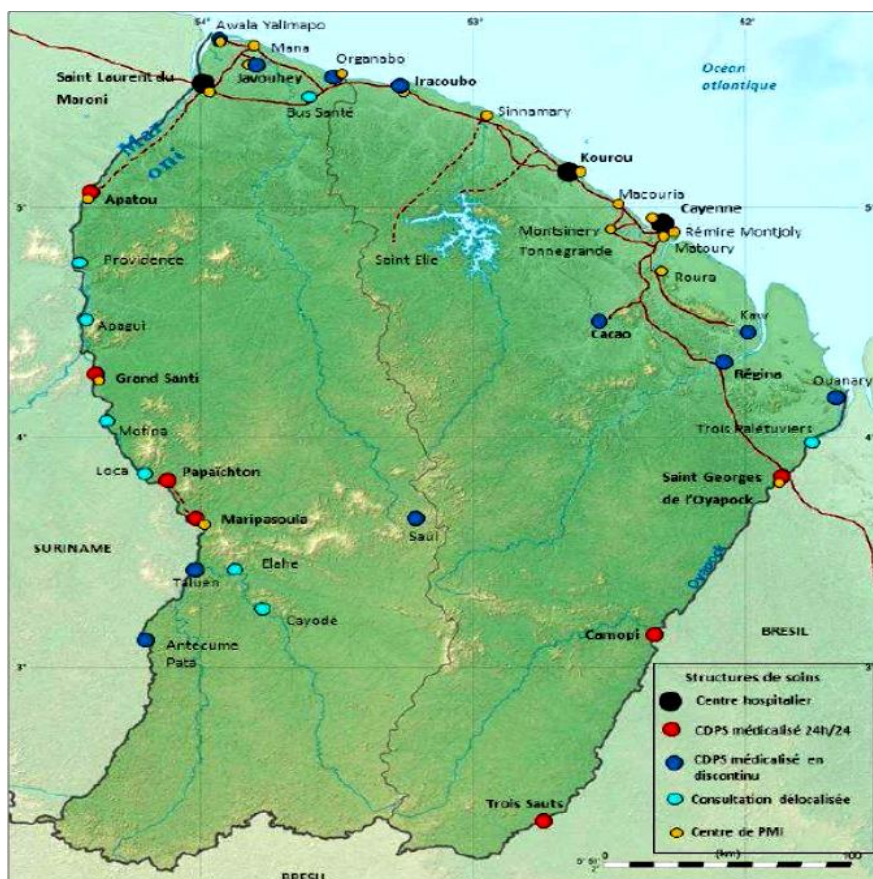
comprenant l'aménagement du territoire, l'amélioration des conditions sanitaires et prenne en considération le désir des populations des zones isolées à modifier ou non leurs habitudes de vie que ces modifications risquent d'engendrer. Les données récentes de *E. Mosnier* PALUSTOP montrent qu'il n'existe pas de différences significatives du nombre d'épisodes diarrhéiques au cours des six derniers mois entre les patients parasités et non parasités, de même, les symptômes évocateurs de parasitoses intestinales sont retrouvés sans différence significatives dans les deux groupes ($p < 0,05$). Ces résultats nous amènent à penser qu'il serait intéressant de rechercher d'autres étiologies de diarrhées dans ces populations.

- L'utilisation de notre outil sur des prélèvements de terre pourrait permettre d'étayer les connaissances sur la répartition des parasites dans les sols selon différentes régions afin d'incrémenter les données épidémiologiques dans ce domaine (97).

L'arrivée sur le marché de nouvelles techniques de diagnostic combinant la technologie qPCR multiplex et microarray comme Novodiag stool parasite de Mobidiag® commercialisé en 2019, rend dorénavant possible la détection simultanée de 26 parasites intestinaux comprenant protozoaires, helminthes et microsporidies. Ces nouvelles technologies permettent d'imaginer la qPCR comme futur gold standard dans le domaine de la Parasitologie.

ANNEXES

Annexe 1 : carte CDPS de Guyane



Annexe 2 : Définition de l'Indice Parasitaire (IP)

L'indice parasitaire correspondait au pourcentage de patients parasités par rapport au nombre total sujets examinés.

Annexe 3 : Caractéristiques microscopiques des œufs et larves de *Necatoramericanus*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostomaduodenale* et *Strongyloidesstercoralis* (selon CDC)

OEUFS	Taille (µm)	Forme	Couleur	Nombre cellules		
<i>Necatorameri canus</i>	65 x 40	Ovale ou ellipsoïdale avec une fine coque	Dépourvu avec cellules grises	4 à 8 blastomères		
<i>Ancylostoma duodenale</i>	60 x 40	Ovale ou ellipsoïdale avec une fine coque	Dépourvu avec cellules grises	4 à 8 blastomères		
<i>Ascaris embryonné</i>	60 x 45	Ovoïde avec une coque épaisse	Brun ou jaune, marron	Une cellule séparée de la coque		
<i>Ascaris non embryonné</i>	90 x 40	Allongé, parfois triangulaire, forme irrégulière	brun	Masse irrégulière		
LARVES	RHABITOIDES			STRONGYLOIDES		
	Taille	Appareil génital	Cavité buccale	taille	œsophage	queue
<i>Strongyloides stercoralis</i>	225 µm x 16 µm	allongée, effilée ou pointue située le long de la paroi ventrale autour de la longueur du corps	court, environ 1/2 fois plus long que la largeur de l'extrémité antérieure du corps	550 µm x 20 µm	Étendu, approximativement la moitié du corps	entaillée
<i>ankylostome</i>	250 µm x 17 µm	Discret. Rarement distinct. Lorsque vu, est petit, de la queue que celui de <i>S. stercoralis</i>	Longue, environ aussi long que la largeur du corps	500 µm x 20 µm	Etendu, environ un quart de la longueur du corps	pointue

Automates utilisés :

Annexe 4: Automate d'extraction QIASymphony SP/AS (Qiagen®)



Annexe 5: Thermocycleur Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems



Annexe 6 : Mélange réactionnel pour la qPCR triplex.

	Concentration initiale	Volume (µl)	Concentration finale
ADN		10	
TaqMan® Gene Expression Master Mix	2x	25	1x
Amorce sens Alum	100 µM	0,45	0,9 µM
Amorce AntisensAlum	100 µM	0,45	0,9 µM
Sonde Alum	100µM	0,125	0,25 µM
Amorce Nam	100 µM	0,45	0,9 µM
Amorce Antisens Nam	100 µM	0,45	0,9 µM
Sonde Nam	100 µM	0,125	0,25 µM
Amorce sens Ad	100 µM	0,45	0,9 µM
Amorce AntisensAd	100 µM	0,45	0,9 µM
Sonde Ad	100 µM	0,125	0,25 µM
H ₂ O		11,925	

Annexe 7 : mélange réactionnel pour la qPCR biplex

	Concentration initiale	Volume (µl)	Concentration finale
ADN		10	
TaqMan® Gene Expression Master Mix	2x	25	1x
IPC amorces/ sonde		5	
IPC matrice		1	
Amorce sens Stro	100 µM	0,45	0,9 µM
Amorce AntisensStro	100 µM	0,45	0,9 µM
Sonde Stro	100 µM	0,125	0,25 µM
H2O		7,975	

Annexe 8 : Récapitulatif des valeurs médianes de Ct des échantillons positifs ou négatifs en microscopie

Parasite	Résultat microscopie	Positive	Médiane (Ct)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	positif	2	30,8(24,8<Ct<36,2)
	négatif	0	-
<i>Necatoramericanus</i>	positif	16	35,75(18,8<Ct<38,2)
	négatif	0	-
<i>Ancylostomaduodenale</i>	positif	3	37,4(35,9<Ct<37,8)
	négatif	0	-
<i>Strongyloidesstercoralis</i>	positif	10	33,5(20,1<Ct<36,7)
	négatif	3	27,1(25,6<Ct<36,9)

Annexe 9 : Valeurs médianes des Ct obtenus par qPCR sur l'étude des échantillons HELMINFAG.

Parasite	Résultat microscopie	Positive	Médiane (Ct)
<i>Necatoramericanus</i>	positif	6	33,85(29,5<Ct<38,1)
	négatif	16	35,6(33<Ct<38,8)

Annexe 10 : Valeurs médianes des Ct des échantillons positifs ou négatifs en microscopie.

Parasite	Résultat microscopie	Positive	Médiane (Ct)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	positif	44	35,5(30,1<Ct<39,2)
	négatif	4	37,2(27,8<Ct<38,4)
<i>Necator americanus</i>	positif	9	34,8(30,5<Ct<37,8)
	négatif	5	37,7(33,3<Ct<38,1)
<i>Ancylostomaduodenale</i>	positif	4	35,9(37,1<Ct<37,8)
	négatif	5	37,7(31,8<Ct<38,8)
<i>Strongyloidesstercoralis</i>	positif	1	30,8
	négatif	4	36,3(34,2<Ct<37,2)

Annexe 11 : Répartition des cas diagnostiqués dans le village de Trois-Palétuviers par microscopie et qPCR (n= 149) :

Parasites	Répartition des cas diagnostiqués à Trois-Palétuviers (microscopie et/ou qPCR) (n=149)
<i>Necatoramericanus</i>	1
<i>Ancylostomaduodenale</i>	3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	50
<i>Ascaris lumbricoides et Ancylostomaduodenale</i>	9
<i>Ascaris lumbricoides et Necatoramericanus</i>	11
<i>Ascaris lumbricoides et Strongyloidesstercoralis</i>	1
<i>Ascaris lumbricoides et Ancylostomaduodenale et Strongyloidesstercoralis</i>	1
<i>Ascaris lumbricoides et Necatoramericanus et Strongyloidesstercoralis</i>	3
<i>Ascaris lumbricoides et Necatoramericanus et ancylostomaduodenale</i>	3
<i>Strongyloidesstercoralis et Ancylostomaduodenale</i>	2
<i>Ascaris lumbricoides et Giardia intestinalis</i>	2
<i>Ascaris lumbricoides et Hymenolepis Nana</i>	3
<i>Giardia intestinalis</i>	1
Négatif	60

Annexe 12 : définition d'une zone écologique selon (37) : Zone dans laquelle la distribution d'une espèce d'helminthe ou de son hôte intermédiaire est homogène. Cette homogénéité dépend d'un certain nombre de variables comme la topographie, le type de sol, l'altitude/la température, les précipitations et le gel.

Bibliographie

1. World Health Organization, éditeur. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2015. 191 p.
2. Bartsch SM, Hotez PJ, Asti L, Zapf KM, Bottazzi ME, Diemert DJ, et al. The Global Economic and Health Burden of Human Hookworm Infection. de Silva N, éditeur. PLOS Neglected Tropical Diseases. 8 sept 2016;10(9):e0004922.
3. Bundy DAP, Walson JL, Watkins KL. Worms, wisdom, and wealth: why deworming can make economic sense. Trends in Parasitology. mars 2013; 29(3):142-8.
4. Lorntz B, Lima AA, Guerrant RL, Moore SR, Patrick PD, Niehaus MD, et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1 mai 2002;66(5):590-3.
5. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. The Lancet. mai 2006;367(9521):1521-32.
6. Guyatt et al. H. Do Intestinal Nematodes Affect Productivity in Adulthood?
7. Jozefzoon LM, Oostburg BF. Detection of hookworm and hookworm-like larvae in human fecocultures in Suriname. Am J Trop Med Hyg. oct 1994;51(4):501-5.
8. Chammartin F, Scholte RG, Guimarães LH, Tanner M, Utzinger J, Vounatsou P. Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases. juin 2013;13(6): 507-18.
9. Carne B, Motard A, Bau P, Day C, Aznar C, Moreau B. Intestinal parasitoses among Wayampi Indians from French Guiana. Parasite. juin 2002;9(2):167-74.
10. Carne B. [Human parasitoses in French Guiana]. Presse Med. 3 nov 2001;30(32):1601-8.
11. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular Testing for Clinical Diagnosis and Epidemiological Investigations of Intestinal Parasitic Infections. Clinical Microbiology Reviews. 1 avr 2014;27(2):371-418.
12. Verweij JJ, Brienen EAT, Ziem J, Yelifari L, Polderman AM, Lieshout LV. Simultaneous Detection and Quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator*

- americanus, and Oesophagostomum bifurcum in Fecal Samples Using Multiplex Real-Time PCR. :6.
13. Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements ACA, et al. Application of a Multiplex Quantitative PCR to Assess Prevalence and Intensity Of Intestinal Parasite Infections in a Controlled Clinical Trial. *PLoS Negl Trop Dis.* janv 2016;10(1):e0004380.
 14. Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, et al. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—A systematic review and meta-analysis. *Lok JB, éditeur. PLOS Neglected Tropical Diseases.* 9 févr 2018;12(2):e0006229.
 15. ALOLIA A. PB. Thèse : Epidémiologie des parasitoses intestinales en Guyane française de 2011 à 2016. :58.
 16. Basuni M, Rahumatullah A, Miswan N, Ahmad M, Noordin R, Verweij JJ, et al. A Pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Four Species of Soil-Transmitted Helminths. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 4 févr 2011;84(2):338-43.
 17. TDR Disease Reference Group on Helminth Infections, Weltgesundheitsorganisation, éditeurs. Research priorities for helminth infections: technical report of the TDR Disease Reference Group on Helminth Infections. Geneva: World Health Organization; 2012. 174 p. (WHO technical report series).
 18. Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. *The Lancet.* janv 2018;391(10117):252-65.
 19. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors.* 2014;7(1):37.
 20. Schär F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2288.
 21. Campbell SJ, Biritwum N-K, Woods G, Velleman Y, Fleming F, Stothard JR. Tailoring Water, Sanitation, and Hygiene (WASH) Targets for Soil-Transmitted Helminthiasis and Schistosomiasis Control. *Trends in Parasitology.* janv 2018;34(1):53-63.
 22. Strunz EC, Addiss DG, Stocks ME, Ogden S, Utzinger J, Freeman MC. Water, Sanitation, Hygiene, and Soil-Transmitted Helminth Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. Hales S, éditeur. *PLoS Medicine.* 25 mars 2014;11(3):e1001620.

23. Awasthi S, Pande VK, Fletcher RH. Effectiveness and cost-effectiveness of albendazole in improving nutritional status of pre-school children in urban slums. *Indian Pediatr.* janv 2000;37(1):19-29.
24. WHO weekly epidemiological record 9th dec 2016.pdf.
25. Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* oct 2009;103(10):967-72.
26. Shang Y, Tang L-H, Zhou S-S, Chen Y-D, Yang Y-C, Lin S-X. Stunting and soil-transmitted-helminth infections among school-age pupils in rural areas of southern China. *Parasites & Vectors.* 2010;3(1):97.
27. Kvalsvig JD, Cooppan RM, Connolly KJ. The effects of parasite infections on cognitive processes in children. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* janv 1991;85(5):551-68.
28. Stoltzfus RJ, Chway HM, Montresor A, Tielsch JM, Jape JK, Albonico M, et al. Low Dose Daily Iron Supplementation Improves Iron Status and Appetite but Not Anemia, whereas Quarterly Anthelmintic Treatment Improves Growth, Appetite and Anemia in Zanzibari Preschool Children. *The Journal of Nutrition.* 1 févr 2004;134(2):348-56.
29. World Health Organization, éditeur. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: Department of Reproductive health and Research, World Health Organization; 2010. 172 p.
30. INSEE. (page consultée le 15 juin 2018). Institut nationale de la statistique et des études économiques, [en ligne]. [Internet]. Disponible sur: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2540209>
31. Mosnier E. Epidémiologie des maladies infectieuses et épidémiques en milieu isolé Amazonien. :236.
32. Grenand F, Haxaire C. Monographie d'un abattis Wayāpi. *jatba.* 1977;24(4):285-310.
33. ARS diagnostic pour l'alimentation en eau potable des ecarts de la commune de Camopi.pdf.
34. Moullet D, Saffache P, Transler A-L. L'orpaillage en Guyane française : synthèse des connaissances. *Études caribéennes* [Internet]. 1 juill 2006 [cité 20 févr 2019];(4). Disponible sur: <http://journals.openedition.org/etudescaribeennes/753>

35. Mosnier É, Ledrans M, Ville M, Renaud M, Chesneau P, Rousset D, et al. // Multiple outbreaks in gold washing camps in the amazon forest (French Guiana): what are lessons learned to improve access to prevention and care? :9.
36. Brottier J. Des Antilles et de la Guyane. :96.
37. Weltgesundheitsorganisation, éditeur. Schistosomiase et géohelminthiases: prévention et lutte ; rapport d'un comité d'experts de l'OMS ; [le Comité OMS d'Experts sur la Schistosomiase et les Géohelminthiases: Prévention et Lutte s'est réuni à Genève du 8 au 14 octobre 2001]. Genève: Organisation Mondiale de la Santé; 2004. 68 p. (OMS, série de rapports techniques).
38. Stefani A, Cheuret M, N'Guyen D, Simon S, Brousse P, Carme B, et al. Interactions between Gastrointestinal Nematodes and Malaria in a Cohort of Children in an Amazonian Village. *Journal of Tropical Pediatrics*. sept 2016;Epub ahead of print.
39. Brooker S, Clements ACA, Bundy DAP. Global Epidemiology, Ecology and Control of Soil-Transmitted Helminth Infections. In: *Advances in Parasitology* [Internet]. Elsevier; 2006 [cité 5 sept 2018]. p. 221-61. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X05620076>
40. Christen J-R, Mura M, Roudaut G, Drogoul A-S, Demar M, Briolant S, et al. Evolution of the prevalence of intestinal parasitic infections among the French armed forces in French Guiana: Table 1. *Journal of Travel Medicine*. juill 2016;24(1):taw070.
41. Organisation mondiale de la santé. Lutte contre les helminthiases chez les enfants d'âge scolaire: guide à l'intention des responsables des programmes de lutte. 2012.
42. Charlotte D. Description de la circulation des parasites intestinaux en Guadeloupe. 2006;86.
43. Aiken AM, Davey C, Hargreaves JR, Hayes RJ. Re-analysis of health and educational impacts of a school-based deworming programme in western Kenya: a pure replication. *Int J Epidemiol*. oct 2015;44(5):1572-80.
44. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez M-G, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. de Silva N, éditeur. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 24 juill 2014;8(7):e2865.
45. Truscott J, Turner H, Anderson R. What impact will the achievement of the current World Health Organisation targets for anthelmintic treatment coverage in

children have on the intensity of soil transmitted helminth infections? *Parasites & Vectors* [Internet]. déc 2015 [cité 21 févr 2019];8(1). Disponible sur: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/551>

46. Taylor-Robinson DC, Maayan N, Soares-Weiser K, Donegan S, Garner P. Deworming drugs for soil-transmitted intestinal worms in children: effects on nutritional indicators, haemoglobin, and school performance. *Cochrane Infectious Diseases Group*, éditeur. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 23 juill 2015 [cité 21 févr 2019]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD000371.pub6>
47. Welch VA, Ghogomu E, Hossain A, Awasthi S, Bhutta ZA, Cumberbatch C, et al. Mass deworming to improve developmental health and wellbeing of children in low-income and middle-income countries: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet Global Health*. janv 2017;5(1):e40-50.
48. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. oct 2004;20(10):469-76.
49. Kaplan RM. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. oct 2004;20(10):477-81.
50. Vercruyse J, Albonico M, Behnke JM, Kotze AC, Prichard RK, McCarthy JS, et al. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. déc 2011;1(1):14-27.
51. Pierre C, Civatte M, Chevalier A, Terrier JP, Gros P, Carloz E. [Helminth diagnosis in pathologic anatomy]. *Med Trop (Mars)*. 1998;58(1):85-97.
52. Lamberton PHL, Jourdan PM. Human Ascariasis: Diagnostics Update. *Current Tropical Medicine Reports*. déc 2015;2(4):189-200.
53. Weltgesundheitsorganisation, éditeur. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee; [the WHO Expert Committee on the Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis met in Geneva from 8 to 14 October 2001]. Geneva: World Health Organization; 2002. 57 p. (WHO technical report series).
54. Petithory JC, Ardoin FG. [Bowel parasites and faecal eosinophilia]. *Bull Soc Pathol Exot*. mai 2006;99(2):91-3.

55. Weltgesundheitsorganisation, éditeur. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions ; a manual for health professionals and programme managers. Geneva: World Health Organization; 2006. 62 p.
56. Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The Laboratory Diagnosis and Follow Up of Strongyloidiasis: A Systematic Review. Bottazzi ME, éditeur. PLoS Neglected Tropical Diseases. 17 janv 2013;7(1):e2002.
57. Cringoli G. Flotac, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. Parassitologia. sept 2006;48(3):381-4.
58. Knopp S, Glinz D, Rinaldi L, Mohammed KA, N’Goran EK, Stothard JR, et al. FLOTAC: A promising technique for detecting helminth eggs in human faeces. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. déc 2009;103(12):1190-4.
59. Nikolay B, Brooker SJ, Pullan RL. Sensitivity of diagnostic tests for human soil-transmitted helminth infections: a meta-analysis in the absence of a true gold standard. International Journal for Parasitology. oct 2014;44(11):765-74.
60. Rascoe LN, Price C, Shin SH, McAuliffe I, Priest JW, Handali S. Development of Ss-NIE-1 Recombinant Antigen Based Assays for Immunodiagnosis of Strongyloidiasis. Taylan Ozkan A, éditeur. PLOS Neglected Tropical Diseases. 10 avr 2015;9(4):e0003694.
61. Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruyse J, Utzinger J, et al. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. Nat Protoc. sept 2017;12(9):1723-32.
62. Bailenger J. Les méthodes diphasiques de concentration parasitaire en Coprologie : Explication de leurs divergences par l’énoncé de leur principe. Ann Parasitol Hum Comp. 1966;41(6):607-22.
63. Mohammed AS, Daubenberger C, Benninghoff M, Knopp S, Schindler T, Rothen J, et al. Diagnostic Accuracy of Kato–Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR Methods for the Detection of Light-Intensity Hookworm and Strongyloides stercoralis Infections in Tanzania. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 5 mars 2014;90(3):535-45.
64. Shiroma Y, Toma H, Kobayashi J, Sato Y. Efficacy of Stool Examination for Detection of Strongyloides Infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1 sept 1995;53(3):248-50.

65. Travers-Moussinet L. La strongyloïdose des carnivores domestiques : étude rétrospective de quinze cas cliniques suivis à l'enva.
66. Schaible UE, Kaufmann SHE. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. PLoS Med. 1 mai 2007;4(5):e115.
67. Nabha L, Krishnan S, Ramanathan R, Mejia R, Roby G, Sheikh V, et al. Prevalence of *Strongyloides stercoralis* in an urban US AIDS cohort. Pathogens and Global Health. août 2012;106(4):238-44.
68. Ndao M. Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2009;2009:1-15.
69. Kain KC, Loutfy MR, Wilson M, Keystone JS. Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in a non-endemic area. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1 juin 2002;66(6):749-52.
70. Bhattacharyya T, Santra A, Majumder DNG, Chatterjee BP. Possible Approach for Serodiagnosis of Ascariasis by Evaluation of Immunoglobulin G4 Response Using *Ascaris lumbricoides* Somatic Antigen. Journal of Clinical Microbiology. 1 août 2001;39(8):2991-4.
71. Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, Iadarola MJ, Neva FA, Nutman TB. A Luciferase Immunoprecipitation Systems Assay Enhances the Sensitivity and Specificity of Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. J INFECT DIS. août 2008;198(3):444-51.
72. Sykes AM, McCarthy JS. A Coproantigen Diagnostic Test for Strongyloides Infection. Carvalho EM, éditeur. PLoS Negl Trop Dis. 8 févr 2011;5(2):e955.
73. Toledo B, Corral MA, Meisel DMCL, Gottardi M, Abdala E, Costa SF, et al. Screening of Strongyloides infection using an ELISA test in transplant candidates. Clinics. 2019;74:e698.
74. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1 janv 1986;51(0):263-73.
75. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. BioTechniques. janv 1999;26(1):112-25.
76. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Research. 1 oct 1996;6(10):995-1001.
77. Easton AV, Oliveira RG, O'Connell EM, Kepha S, Mwandawiro CS, Njenga SM, et al. Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: field-based inferences on the impact of

- mass deworming. *Parasites & Vectors* [Internet]. déc 2016 [cité 25 juill 2018];9(1). Disponible sur: <http://www.parasitesandvectors.com/content/9/1/38>
78. Repetto SA, Soto CDA, Cazorla SI, Tayeldin ML, Cuello S, Lasala MB, et al. An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. *Acta Tropica*. mai 2013;126(2):110-4.
 79. Harmon AF, Zarlenga DS, Hildreth MB. Improved methods for isolating DNA from *Ostertagia ostertagi* eggs in cattle feces. *Veterinary Parasitology*. févr 2006;135(3-4):297-302.
 80. Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, et al. A Laboratory-Developed TaqMan Array Card for Simultaneous Detection of 19 Enteropathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 févr 2013;51(2):472-80.
 81. Mejia R, Vicuña Y, Vaca M, Cooper PJ, Chico M, Nutman TB, et al. A Novel, Multi-Parallel, Real-Time Polymerase Chain Reaction Approach for Eight Gastrointestinal Parasites Provides Improved Diagnostic Capabilities to Resource-Limited At-Risk Populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 5 juin 2013;88(6):1041-7.
 82. Sultana Y, Jeoffreys N, Watts MR, Gilbert GL, Lee R. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. *Am J Trop Med Hyg*. juin 2013;88(6):1048-51.
 83. Pilotte N, Papaïakovou M, Grant JR, Bierwert LA, Llewellyn S, McCarthy JS, et al. Improved PCR-Based Detection of Soil Transmitted Helminth Infections Using a Next-Generation Sequencing Approach to Assay Design. *PLoS Negl Trop Dis*. mars 2016;10(3):e0004578.
 84. Pecson BM, Barrios JA, Johnson DR, Nelson KL. A Real-Time PCR Method for Quantifying Viable *Ascaris* Eggs Using the First Internally Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 1 déc 2006;72(12):7864-72.
 85. O'Connell EM, Nutman TB. Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 7 sept 2016;95(3):508-13.
 86. Wang J-X, Pan C-S, Cui L-W. Application of a real-time PCR method for detecting and monitoring hookworm *Necator americanus* infections in Southern China. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. déc 2012;2(12):925-9.
 87. Repetto SA, Ruybal P, Solana ME, López C, Berini CA, Alba Soto CD, et al. Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of

Strongyloides stercoralis out of endemic area: A proposed algorithm. *Acta Tropica*. mai 2016;157:169-77.

88. Arndt MB, John-Stewart G, Richardson BA, Singa B, van Lieshout L, Verweij JJ, et al. Impact of helminth diagnostic test performance on estimation of risk factors and outcomes in HIV-positive adults. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e81915.
89. Michaud C, Therycasari E, Brousse P, Djossou F, Moriceau O, Demar M, et al. Prévalence importante des parasitoses digestives dans une commune amazonienne isolée : une urgence de santé publique. *Médecine et Maladies Infectieuses*. juin 2019;49(4):S121-2.
90. Ziegelbauer K, Speich B, Mäusezahl D, Bos R, Keiser J, Utzinger J. Effect of Sanitation on Soil-Transmitted Helminth Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Hales S, éditeur. *PLoS Med*. 24 janv 2012;9(1):e1001162.
91. Meurs L, Polderman AM, Vinkeles Melchers NVS, Brienen EAT, Verweij JJ, Groosjohan B, et al. Diagnosing Polyparasitism in a High-Prevalence Setting in Beira, Mozambique: Detection of Intestinal Parasites in Fecal Samples by Microscopy and Real-Time PCR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005310.
92. Cools P, Vlaminck J, Albonico M, Ame S, Ayana M, José Antonio BP, et al. Diagnostic performance of a single and duplicate Kato-Katz, Mini-FLOTAC, FECPAKG2 and qPCR for the detection and quantification of soil-transmitted helminths in three endemic countries. Freeman MC, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 1 août 2019;13(8):e0007446.
93. Sanprasert V, Kerdkaew R, Srirungruang S, Charuchaibovorn S, Phadungsaksawasdi K, Nuchprayoon S. Development of Conventional Multiplex PCR: A Rapid Technique for Simultaneous Detection of Soil-Transmitted Helminths. *Pathogens*. 16 sept 2019;8(3):152.
94. Ayana M, Cools P, Mekonnen Z, Biruksew A, Dana D, Rashwan N, et al. Comparison of four DNA extraction and three preservation protocols for the molecular detection and quantification of soil-transmitted helminths in stool. Cantacessi C, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 28 oct 2019;13(10):e0007778.
95. Cools P, Addiss D, Ayana M, Cantera J, Dana D, Imtiaz R, Lammie P, McCarty J, Mejia R, Mekonnen Z, Njenga S, Noordin R, Ajjampur SSR, Van Esbroeck M, van Lieshout L, Vlaminck J, Vercruyse J, Williams S, Verweij JJ, Levecke B. First international external quality assessment study for nucleic acid amplification tests for soil-transmitted helminths: the study protocol. 2017, Congress of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, US.

96. Albonico M. Epidemiological evidence for a differential effect of hookworm species, *Ancylostoma duodenale* or *Necator americanus*, on iron status of children. *International Journal of Epidemiology*. 1 juin 1998;27(3):530-7.
97. Collender PA, Kirby AE, Addiss DG, Freeman MC, Remais JV. Methods for Quantification of Soil-Transmitted Helminths in Environmental Media: Current Techniques and Recent Advances. *Trends in Parasitology*. déc 2015;31(12):625-39.