

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Relizane
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Sciences Biologiques



جامعة غليزان
RELIZANE UNIVERSITY

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en : Parasitologie

Intitulé

L'utilisation de la PCR pour l'identification des
parasites intestinaux

Présenté par :

CHAIB Benhenni

BELAOUEDJ Kheira

Devant les membres de jury :

Président : Dr. NABTI Ismahane

Maître de conférences B (U. Relizane)

Encadrant : Dr. SEBAA Sarra

Maître de conférences B (U. Relizane)

Examineur : Dr. BEKHEDDA Hadjer

Maître de conférences B (U. Relizane)

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Au nom de Dieu , le Tout Miséricordieux , le Très Miséricordieux , et que les prières soient sur le plus noble des messagers.

Tout d'abord « nous rendons grâce à Dieu Tout-Puissant qui nous a guidés dans ce parcours « nous donnant la force et la patience pour le mener à bien de la meilleure manière .

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadrante Dr. SEBAA Sarra pour la confiance qu'elle nous a accordée afin de réaliser notre travail de manière optimale , pour son accompagnement jusqu'au bout , son soutien précieux et les conseils qu'elle nous a prodigués. Nous avons beaucoup d'estime et d'affection pour elle et avons été honorés de travailler à ses côtés .

Nous remercions également sincèrement les membres du jury Dr. NABTI Ismahane, Présidente et Dr. BEKHEDDA Hadjer, Examinatrice, pour avoir accepté d'étudier ce modeste travail et d'y consacrer leur temps afin de l'analyser et de l'évaluer .

Enfin, nous adressons nos remerciements à nos parents « frères « sœurs « amis et enfants qui nous ont soutenus tout au long de cette période « ainsi qu'à toutes les personnes qui « de près ou de loin « ont contribué à la réalisation de ce travail .

Dédicace

Je dédie ce travail à :

L'âme pure de mon père .

Ma chère mère.

Ma chère sœur.

Ma femme, ma compagne et la mère de mes enfants.

Mes fils : Abderrahmane, Mohammed Al-Amin et Ahmed Mansour.

Mes filles : Ahlem, Bouchra, Cherifa Rafif .

Mon petit-fils Mohammed Saned .

Mes collègues de travail.

Étudiants en Master 2 à la Faculté des Sciences de la Nature et de la

Vie, Université de Relizane, spécialité Parasitologie, promotion 2024/2025 .

Mes chers professeurs .

Ma collègue dans ce travail Belaouedj Kheira.

Benhenni

Dédicace

Seigneur ‘inspire-moi de reconnaître Tes bienfaits que Tu as accordés à mes parents et à moi ‘et de faire le bien qui Te satisfait .Améliore ma situation et guide-moi .

Louange à Allah ‘et que les prières et la bénédiction soient sur le Bien-Aimé Élu (Mohammed) ,sa famille et ses fidèles compagnons .

Louange à Allah qui m’a guidé pour valoriser cette étape de mon parcours académique à travers ce mémoire ‘fruit de l’effort et du succès par Sa Grâce .Je le dédie à mes chers parents : à ma mère ‘qu’Allah la préserve ‘et à mon père ‘ qu’Allah le fasse résider dans le Jardin suprême (Al-Firdaws).

Ainsi qu’à toute ma famille bien-aimée qui m’a soutenu tout au long de mes études jusqu’à leur terme .

Un merci et une gratitude particulière à mon professeur et collègue Benhenni Chaïb ‘qui m’a encouragé et soutenu dans ce travail ‘ainsi qu’à tous nos amis et enseignants – chacun par son nom et son mérite .Nous vous offrons notre modeste travail en signe de reconnaissance pour votre bonté et en hommage à vos efforts .

Merci .

B .Kheira

Résumé :

Ce mémoire est un travail de synthèse qui vise à comparer les performances du kit NovoDiag® Stool Parasite (PCR multiplex) avec d'autres méthodes de diagnostic existantes, telles que l'examen microscopique direct et les PCR simplex de routine, afin de déterminer sa sensibilité et sa spécificité pour détecter divers parasites intestinaux, notamment *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides* et *Taenia saginata*.

Certains laboratoires au niveau internationale utilisent la PCR multiplex : NovoDiag® Stool Parasite pour diagnostiquer la présence des parasites. Cette méthode regroupe un large panel de 26 cibles différentes correspondant à 30 pathogènes intestinaux, protozoaires et helminthes. La cohorte étudiée comporte 36 échantillons de selles, 26 appartenant au groupe test et 10 témoins négatifs, issus de donneurs de greffe fécale. Le groupe test a été sélectionné d'après les résultats de l'examen parasitologique des selles positif (examen direct au microscope et/ou PCR routine) . En dépit d'une cohorte restreinte, le kit NovoDiag® Stool parasite a montré une bonne sensibilité (100%) pour les pathogènes suivants : *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata* et une bonne sensibilité pour *Giardia intestinalis* (87.5%). Concernant *Entamoeba histolytica* les résultats sont très décevants.

Ce travail a montré les avantages et les limites de l'utilisation de la PCR dans le diagnostic des parasitoses intestinales, en mettant en lumière les résultats prometteurs pour certains pathogènes et les éventuelles lacunes pour d'autres.

Mots clés : protozoaires, helminthes, NovoDiag® Stool Parasite, PCR multiplex examen parasitologique de selles .

الملخص :

تهدف هذه الدراسة النظرية إلى مقارنة مختلف تشخيصات NovoDiag® Stool Parasite (Multiplex PCR) مع طرق التشخيصات الأخرى مثل الفحص المجهرى و (PCR simplex) من أجل الكشف عن وجود مختلف الطفيليات المعوية من عدمه بما في ذلك :
Taenia saginata و *Ascaris lumbricoides* و *Entamoeba histolytica* و *Giardia intestinalis*

تشمل مجموعة الدراسة 36 عينة براز، 26 منها تنتمي إلى مجموعة الاختبار و 10 عينات سلبية، تم الحصول عليها من متبرعين .

أظهرت مجموعة طفيليات البراز NovoDiag® حساسية جيدة (100%) لمسببات الأمراض التالية :
Taenia saginata و *Ascaris lumbricoides*، وحساسية جيدة لـ *Giardia intestinalis* (87.5%) .
أما فيما يتعلق بـ *Entamoeba histolytica*، فقد كانت النتائج غير جيدة .

بينت هذه الدراسة مزايا و عيوب استخدام تفاعل (PCR) في تشخيص العدوى الطفيلية المعوية مسلطاً الضوء على نتائج جيدة لبعض مسببات الأمراض، و غير كافية لبعضها الآخر..

الكلمات المفتاحية : الطفيليات الأولية - الديدان الطفيلية - الفحص المجهرى - NovoDiag® Stool Parasite .

Abstract :

This thesis is a synthesis work aimed at comparing the performance of the NovoDiag® Stool Parasite Kit (multiplex PCR) with other existing diagnostic methods, such as direct microscopic examination and routine simplex PCR, to determine its sensitivity and specificity for detecting various intestinal parasites, including *Giardia intestinalis* , *Entamoeba histolytica* , *Ascaris lumbricoides* , and *Taenia saginata* .

Some laboratories internationally use the NovoDiag® Stool Parasite multiplex PCR to diagnose the presence of parasites. This method includes a wide panel of 26 different targets corresponding to 30 intestinal pathogens, protozoa, and helminthes. The study cohort includes 36 stool samples, 26 belonging to the test group and 10 negative controls, obtained from fecal transplant donors. The test group was selected based on the results of positive stool parasitological examination (direct microscopy and/or routine PCR). Despite a small cohort, the NovoDiag® Stool parasite kit demonstrated good sensitivity (100%) for the following pathogens: *Ascaris lumbricoides* and *Taenia saginata*, and good sensitivity for *Giardia intestinalis* (87.5%). Regarding *Entamoeba histolytica*, the results were very disappointing.

This study demonstrated the advantages and limitations of using PCR in the diagnosis of intestinal parasitic infections, highlighting promising results for some pathogens and potential shortcomings for others.

Keywords : protozoa , helminthes , NovoDiag® Stool Parasite , multiplex PCR stool parasitological examination .

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION	01
Chapitre 01	04
Parasites Intestinaux chez l'Homme	04
Définition	05
Classification des Parasites Intestinaux	05
I. LES PROTOZOOSSES INTESTINALES LES PLUS FREQUENTES	06
I.1. <i>Giardiase - Giardia lamblia-</i> (G. intestinalis)	06
I.1.1. Morphologie du parasite :	06
I.1.1.2. Cycle évolutif de <i>Giardia intestinalis</i>	07
I.1.1.3. Symptômes	08
I.1.1.4. Épidémiologie	08
I.1.1.5. Mode de transmission	09
I.2. Amibiase - <i>Entamoeba histolytica</i> –	09
I.2.1. Morphologie du parasite	09
I.2.2. Cycle évolutif d' <i>Entamoeba histolytica</i>	10
I.2.3. Symptômes	10
I.2.4. Epidémiologie	11
I.2.5. Mode de transmission	11
II. LES HELMINTHIASES INTESTINALES LES PLUS FREQUENTES	12
II.1. Cestodes	12
II.1.1. Téniasis - <i>Tænia solium-</i>	12

II.1.1.2 Morphologie parasitaire :	12
II.1.1.3. Cycles évolutifs : <i>Tænia solium</i>	13
II.1.1.4. <i>Symptômes</i>	14
II.1.1.5. Épidémiologie :	14
II.1.1.6. Mode de transmission :	15
II.2. Nématodes	15
II.2.1. Ascariose - <i>Ascaris lumbricoïdes</i>	15
II.2.1.1. Morphologie parasitaire	15
II.2.1.2. Le cycle parasitaire	16
II.2.1.3. Symptômes de l'infection par <i>Ascaris</i>	17
II.2.1.4. Épidémiologie	18
II.2.1.5. Mode de transmission	18
Chapitre 02	19
Techniques de Diagnostic des Parasites Intestinaux	19
I.1. Diagnostic clinique :	20
I.2. Diagnostic parasitologique et conférence par examen parasitologie spécifique des selles	21
I.2.1. Examen macroscopique	21
II. Examen microscopique	21
II.1. Examen microscopique direct sans concentration	21
II.2. Examen microscopique après concentration	22
III. Techniques de diagnostic moléculaire	22
III.1. Polymérase Chain Réaction (PCR)	23
III.1.1. Principe de la PCR	23
III.1.2. Les étapes de la PCR	24
III.1.3. Avantages et limites de la PCR	27
III.1.4. Exemples de parasites identifiables par PCR.	29

III.1.4.1. <i>Giardia lamblia</i> (<i>Giardia intestinalis</i>).	29
III.1.4.2. <i>Entamoeba histolytica</i>	29
III.1.4.3. <i>Taenia spp.</i> (<i>Ténias</i>)	29
III.1.4.4. <i>Ascaris lombricoïdes</i>	29
Partie Expérimentale	30
Chapitre 03	31
matériel et méthodes	31
I-Sélection des échantillons	32
II- Fonctionnement général du test NovoDiag [®] Stool Parasite	32
III- Protocole d'analyse NOVODIAG [®] Stool Parasite	33
IV- PCR simplex routine	34
Chapitre 04	35
Résultats	36
<i>Discussion</i>	39
<i>Conclusion</i>	43
Références bibliographiques	44
Annexe	49

Liste des figures

Figure 1 :	Trophozoïte et kyste de <i>Giardia intestinalis</i> .	07
Figure 2 :	Forme végétative et kystique de <i>Giardia intestinalis</i>	07
Figure 3 :	Cycle évolutif de <i>Giardia intestinalis</i>	08
Figure 4:	Formes végétative et kystique du complexe <i>E.histolytica/E.dispar</i>	09
Figure 5 :	Cycle évolutif d' <i>Entamoeba histolytica</i>	10
Figure 6:	Œuf de <i>Tænia sp</i> et scolex de <i>T. saginata</i>	13
Figure 7:	Cycle évolutif de <i>T. saginata</i> et <i>T. solium</i>	14
Figure 8 :	<i>Ascaris</i> (<i>Ascaris lumbricoides</i>) femelle	15
Figure 9 :	<i>Ascaris</i> mâle (en coupe, vu au microscope, grossi 200x)	16
Figure 10:	Œufs (non embryonné et embryonné) et adultes d'A. lumbricoides	16
Figure 11:	Cycles évolutifs d' <i>Ascaris lumbricoides</i> .	17
Figure 12 :	Les étapes de la PCR	25
Figure 13 :	Technique de PCR classique	26

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Classification des protozoaires intestinaux .	06
Tableau 2 :	Classification des helminthes intestinaux .	12
Tableau 3 :	récapitulatif de la différence entre la PCR de routine et la PCR par le kit NovoDiag® Stool Parasite	34
Tableau 4 :	Synthèse des résultats obtenus après analyse par le kit NovoDiag® Stool Parasite.	37

Liste des abréviations :

E.histolytica : *Entamoeba histolytica*

E.dispar : *Entamoeba dispar*

T. saginata: *Tænia saginata*

G. intestinalis : *Giardia intestinalis*

A. lumbricoides : *Ascaris lumbricoides*

EPS : Examen parasitologique des selles

Glossaire :

parasite : est un organisme vivant sur ou à l'intérieur d'un autre organisme, appelé hôte , et dont il tire des nutriments. Cette relation, appelée parasitisme , profite au parasite tout en nuisant souvent à l'hôte, sans toutefois entraîner sa mort .

L'hôte : est un organisme sur ou dans lequel vit un parasite .

Parasites intestinaux : sont des parasites qui occupent le tube digestif. Chez l'homme, ils se répandent souvent par manque d'hygiène liée aux fèces

Protozoaires : Organismes unicellulaires, tels que *Plasmodium* (qui cause le paludisme).

Helminthes : Parasites ressemblant à des vers, notamment les ténias et les *Ascaris*.

PCR : La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une méthode largement utilisée en biologie moléculaire pour **amplifier des séquences d'ADN** , produisant des millions, voire des milliards de copies d'un segment d'ADN spécifique.

Le test Novodiag® pour les parasites des selles : est un test de diagnostic moléculaire avancé, entièrement automatisé, conçu pour la détection rapide et complète des parasites intestinaux directement à partir d'échantillons de selles. Il utilise une combinaison de PCR en temps réel et de technologies de micro array pour identifier les marqueurs d'acides nucléiques de divers protozoaires, helminthes et micro sporidies.

Fast Prep : Préparation rapide est une marque de systèmes d'homogénéisation utilisés en biologie moléculaire utilisé en biologie moléculaire pour la lyse rapide et efficace) des échantillons résistants comme les bactéries, les champignons, les tissus matériel . C'est souvent extraction (ouverture) d'échantillons biologiques résistants comme des bactéries, des champignons, des tissus et des matières végétales. Cette méthode est souvent utilisée en combinaison avec des protocoles d'extraction d'ADN, d'ARN ou de protéines.

NucliSens® easyMAG™ : Le Nucli Sens® easy MAG™ nucléique est un système automatisé d'extraction d'acide nucléique développé par bio ML agrément en clinique laboratoires cliniques pour l'extraction du noyau total Développé par bio Mérieux, il est largement utilisé en laboratoire clinique et de recherche pour l'extraction d'acides nucléiques totaux (ADN et/ou ARN). provenant de divers types d'échantillons, notamment des selles , du

sang , du plasma , du sérum , des échantillons respiratoires , etc. partir d'une variété de types d'échantillons, notamment des selles, du sang, du plasma, du sérum, des échantillons respiratoires, etc.

Film Array® : est un système de diagnostic moléculaire développé par développé par bio Mérieux (anciennement par Bio Fire Diagnostics) pour des tests PCR rapides et multiplex , permet aux cliniciens Il est conçu pour des tests PCR multiplex rapides , permettant aux cliniciens de détecter plusieurs agents pathogènes à partir d'un seul échantillon, en une heure environ .

Bio Fire : est une société de diagnostic moléculaire des systèmes basés sur la les maladies . Leurs plus célèbres système est une entreprise de diagnostic moléculaire qui produit des systèmes rapides et multiplexés basés sur la PCR pour la détection des maladies infectieuses .

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Un parasite (du grec parasitos : pique-assiette) est un organisme qui se nourrit et se développe aux dépens d'un autre être vivant « l'hôte » soit à la surface ou à l'intérieur duquel il vit.

Le degré de parasitisme reflète le degré de préjudice commis à l'hôte, allant de la symbiose (équilibre de la relation) à la mort de l'hôte. Une grande variété des parasites vivent dans le tube digestif appartiennent à deux groupes zoologiques différents : les protozoaires et les helminthes (Nicolas X et *al*, 2001). La majorité de ces parasitoses ne sont pas spécifiques de l'homme, mais communes à l'homme et à des animaux (Nicolas X et *al*, 2001) .

Les parasitoses intestinales sont des maladies dues à la présence dans le tube digestif humain ou animal des parasites appartenant à deux embranchements celui de protozoaires qui comprend des espèces unicellulaires mobiles ou non et celui des helminthes comprenant des espèces pluricellulaires (Ouraiba et Seghir, 2014)

Le tube digestif de l'être humain et des animaux peut être colonisé par diverses espèces parasitaires. Cette variation due à différents facteurs notamment environnementaux et socio-économiques et /ou ceux liés aux habitudes alimentaires de la population (laamrani, 1999), et peut être à la méconnaissance de l'hygiène alimentaire et le contact fréquent avec le sol.

Les parasitoses intestinales n'étant pas soumises à une déclaration obligatoire (sauf le cas de l'amibiase), et leur prévalence est difficile à connaître. Cependant, l'Organisation mondiale de la santé (**OMS**) en donne des approximations impressionnantes avec une prévalence estimée en 2002, à environ 3,5 milliards de personnes infestées par les parasites intestinaux dans le monde (Ouraiba et Seghir, 2014) .

Les parasites intestinaux peuvent être détectés à l'aide de différentes méthodes diagnostiques en laboratoire. Ces techniques permettent d'identifier la présence de parasites (protozoaires, helminthes) dans les selles ou d'autres échantillons biologiques, notamment des

examens de selles, Techniques immunologiques , Techniques moléculaires (PCR) , autres méthodes selon les cas (Anofel ,2022).

Objectif du travail

L'objectif principal de ce mémoire est d'évaluer l'efficacité de la technique de la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) pour l'identification des parasites intestinaux chez l'homme.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01:

Parasites Intestinaux chez l'Homme

Définition

Selon l'OMS (1988), Les parasitoses intestinales sont des maladies dues à des parasites se développant dans le tube digestif. Elles sont répandues pratiquement dans le monde entier, et présentent une prévalence élevée dans de nombreuses régions. Parmi ces parasites :

Giardia lamblia, *Entamoeba histolytica*, *Tænia solium*, *Ascaris lumbricoïdes*

Classification des Parasites Intestinaux

On distingue deux grands groupes de parasites intestinaux les Protozoaires et les Métazoaires (helminthes),(Wery,1995).

I . Les protozoaires :

Les protozoaires sont des organismes unicellulaires, eucaryotes qui se caractérisent par un cycle de vie complexe qui passe par différentes étapes et parfois par différents hôtes et/ou habitats. La transmission peut se faire par l'eau, les insectes, les plantes ou les aliments contaminés par des débris de matières fécales . (Botero et D. y Restrepo M, 1999).

Les protozoaires ont deux étapes au cours de leur cycle de vie. Il s'agit du trophozoïte et du kyste. Le trophozoïte est la forme végétative du parasite et qui donne lieu au tableau clinique. Le kyste est la forme de résistance et, en même temps, la forme qui assure la transmission à autres hôtes.

Classification des protozoaires intestinaux (PI)

Les PI sont classés selon leur mode de locomotion (les rhizopodes, les flagellé, les ciliés) la classification est présentée dans le tableau ci-dessous .

Tableau 1 : Classification des protozoaires intestinaux (Bourée, 2001).

Embranchement des protozoaires	Classe	Espèces
	Rhizopodes	- <i>Dientamoeba fragilis</i> - <i>Entamoeba histolytica</i> - <i>E. coli</i> - <i>E. polecki</i> - <i>E. hartmanni</i> - <i>Endolimax nana</i> - <i>Pseudolimax butschlii</i> .
	Flagellés	<i>Trichomonas intestinalis</i> - <i>Giardia intestinalis</i> - <i>Chilomastix mesnili</i> - <i>Retortamonas (Embadomonas) intestinalis</i> - <i>Enteromonas hominis</i> .
	Ciliés	<i>Balantidium coli</i>
	Blastocystes	<i>Blastocystis hominis</i>
	Sporozoaires	<i>Isospora belli</i> - <i>Cryptosporidium sp</i> - <i>microsporidium sp</i> - <i>cyclospora cayetanensis</i>

LES PROTOZOSES INTESTINALES LES PLUS FREQUENTES :

I.1. *Giardiase - Giardia lamblia-* (*G. intestinalis*) :

Giardia intestinalis ou *Giardia duodinalis* Agent de la *Giardiase* c'est le parasite le plus fréquemment rencontré dans les parasitoses intestinales (Humbert et al., 2017) et l'une des étiologies parasitaires du syndrome de malabsorption intestinale (Aubry et al , 2018).

I.1.1. Morphologie du parasite :

- Forme végétative : Le trophozoïte est piriforme, mesure 9 à 20 µm de long sur 5 à 12 µm de large . Présente une région dorsale convexe et une région ventrale plate et 4 paires de flagelles responsables de son mouvement caractéristique dit en chute de feuille.

- Forme kystique : les kystes sont ovoïdes et mesurent de 8 à 10 μm de longueur et de 7 à 10 μm de largeur, renferme 4 noyaux et un amas flagellaire dans l'axe et deux corps parabasaux en virgule d'aspect caractéristique en microscope optique.

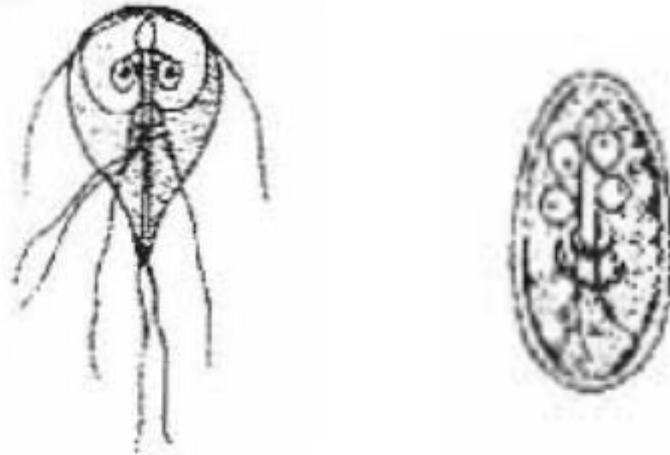


Figure . 1 : Trophozoïte et kyste de *Giardia intestinalis*.

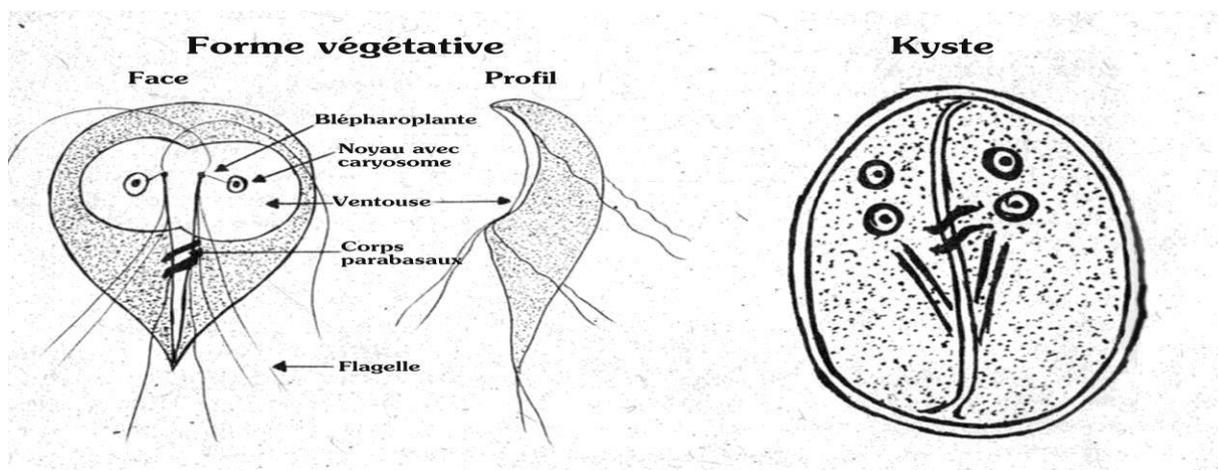


Figure . 2 : Forme végétative et kystique de *Giardia intestinalis* (Farthing, 1998).

I.1.1.2. Cycle évolutif de *Giardia intestinalis*

Le cycle évolutif du parasite est simple sous l'effet du pH gastrique, les kystes ingérés(1), libèrent les trophozoïtes dans l'estomac et le duodénum(2), où ils se multiplient rapidement dans la partie proximale de l'intestin grêle (duodéno-jéjunale).

Le trophozoïte se divise par scissiparité pour donner deux trophozoïtes, ou s'en kyste pour être éliminé dans les selles et contaminer un nouvel hôte(3)(4). Le nombre de kystes excrétés atteint souvent un très grand nombre (figure 3) (Humbert et *al.*, 2017).

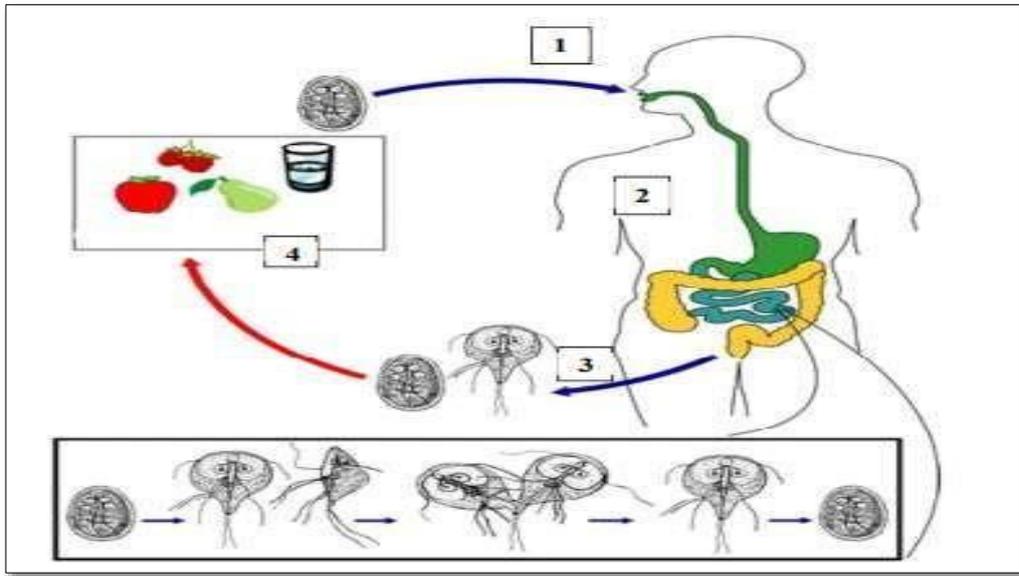


Figure . 3 : Cycle évolutif de *Giardia intestinalis* .

Légende :

- 1 : ingestion du kyste par l'eau de boisson souillée, aliments, légumes,...
- 2 : évolution du kyste dans l'estomac, duodénum, l'intestin
- 3 : élimination de kystes et/ou trophozoïtes infectieux ;
- 4 : contamination des aliments, eaux de boissons, légumes,...FV : forme végétative

I.1.1.3. Symptômes :

G. intestinalis cause la Giardiose qui se manifeste par une diarrhée sous forme de selles pâteuses et glaireuses accompagnés de nausées et douleurs abdominales, une mal absorption chez l'enfant pouvant aller à un retard staturo-pondéral (Magne,1997 ; Guillaume, 2007) .

I.1.1.4. Épidémiologie :

Mondialement, *G. lamblia* est le troisième agent le plus incriminé dans maladies diarrhéiques chez les enfants de moins de 5 ans (après les rota virus et *Cryptosporidium* spp) ; >300 millions de cas sont signalés chaque année. Dans les pays en voie de développement la prévalence est de 20 à 60 % principalement chez les enfants . (Belkessa, S ; Elhosseyn,2021).

I.1.1.5. Mode de transmission :

La transmission est principalement féco-orale directe, par contact avec des humains ou des animaux infectés (chiens, chats, oiseaux, chevaux, chèvres, moutons, vaches).

La transmission féco-orale indirecte, par la consommation d'eau ou d'aliments contaminés par des kystes, est souvent à l'origine des épidémies. Certains comportements sexuels favorisent la transmission.

I.2. Amibiase - *Entamoeba histolytica* –

L'amibe est un parasite responsable de l'amibiase. Il s'agit d'un protozoose prédominance intestinale, qui peut métastaser par voies sanguine ou lymphatique et envahir les tissus. Affection la plus souvent tropicale dans ses manifestations cliniques, l'amibiase est cependant cosmopolite (Ripert, 2003).

I.2.1. Morphologie du parasite :

- Formes végétatives : La forme *histolytica* est plus grande (12 à 40 μm) que la forme *minuta* (10 à 20 μm). Le noyau, possède un caryosome central et une chromatine périphérique fine et régulière. Le cytoplasme est finement granuleux au centre et hyalin en périphérie, contient des vacuoles digestives. Dans la forme *histolytica*, l'endoplasme peut contenir des hématies.

- Forme kystique : Le kyste a une taille moyenne de 10-20 μm , sa forme est sphérique et il est entouré d'une double coque. Il présente entre un à quatre noyaux.

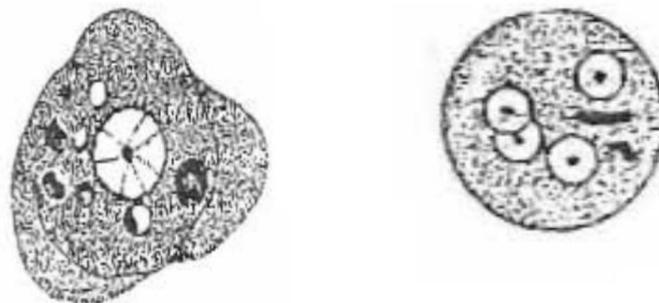


Figure. 4 : Formes végétative et kystique du complexe *E.histolytica/E.dispar*

I.2.2. Cycle évolutif d'*Entamoeba histolytica* :

L'homme se contamine par ingestion de kystes (1), qui se transforment en trophozoïtes dans le côlon sous l'action des sucs digestifs . Ce stade reste intraluminal et se reproduit par scissiparité.

Ces trophozoïtes se transforment en kystes lors de la constitution du bol fécal(2). Une fois dans le tube digestif, *E. histolytica* peut dans certaines conditions (faiblesse de l'état général du patient, modification de la flore intestinale) débiter un cycle pathogène avec invasion de la muqueuse(3)(4)(5) ; elle peut gagner différents organes, le foie en premier lieu, puis éventuellement le poumon et le cerveau (Figure 5) (Durand et al, 2005) .

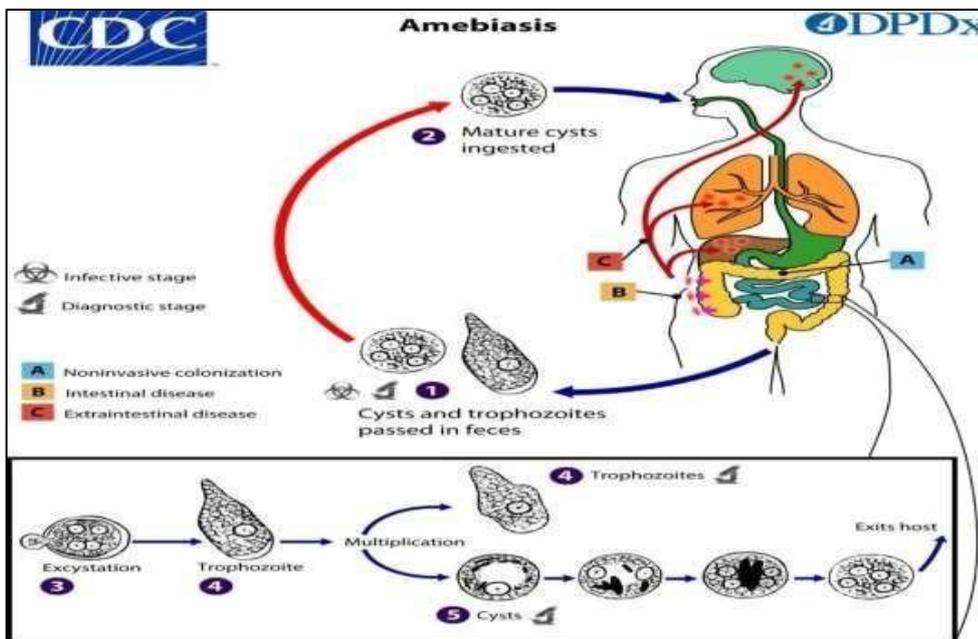


Figure . 5 : Cycle évolutif d'*Entamoeba histolytica* .

I.2.3. Symptômes :

- Amibiase intestinale se manifeste cliniquement sous deux formes principales :

L'Amibiase intestinale aigüe :caractérisée par un syndrome dysentérique typique associant douleurs abdominales, exonération a fécale et absence de fièvre

- Amibiase extra-intestinale : douleur de l'hypochondre droit, fièvre et hépatomégalie pour l'amibiase hépatique qui peut s'étendre au poumon et se disséminer dans d'autres organes (Anofel, 2014) .

I.2.4. Epidémiologie :

Après le paludisme et la bilharziose, l'amibiase est la troisième maladie parasitaire la plus meurtrière au monde . (Stanley, S. L. Amoebiasis, 2003) .

Environ 10% de la population mondiale serait infectée par des amibes du genre *Entamoeba*. Parmi les personnes infectées 10 à 20% développent des signes sévères de la maladie et 40 000 à 100 000 d'entre elles en meurent chaque année, principalement dans les régions chaudes et pauvres du globe (sud-est et ouest de l'Afrique, Asie du Sud-Est, Amérique centrale et du Sud), où les conditions d'hygiène favorisent la transmission parasitaire.

I.2.5. Mode de transmission :

Les malades et les porteurs asymptomatiques sont la seule source de contamination.

La transmission se fait par voie oro-fécale, soit directement par contact de personne à personne (mains sales), soit indirectement par l'intermédiaire d'aliments ou d'eau souillée par des matières fécales contenant des kystes amibiens.

II. Les helminthes :

Ce sont des vers pluricellulaires eucaryotes, macroscopiquement visibles et a sexe séparés.

Les vers adultes sont dépourvus des d'organes locomoteurs et se déplacent grâce à leur plasticité (Benouis, 2012).

Selon le parasite en cause, l'homme peut héberger le ver adulte, ou une forme larvaire, quelquefois même les deux (Bastien, 2011).

Du point de vue de la classification, les helminthes parasites comprennent :

- Némathelminthes ou vers ronds.

La classe des Nématodes est de loin la plus importante en pathologie humaine.

- Plathelminthes ou vers plats.

Ils comprennent sur un plan d'égal importance : la classe des Cestodes et celle des Trématodes (Bastien, 2011).

Classification des helminthes intestinaux

Tableau 2 : Classification des helminthes intestinaux.(Bastien , 2011)

Embranchement des helminthes	Sous Embranchement	Classe	Espèce
	Némathelminthes	Nématodes	- <i>Ascaris lumbricoides</i> - <i>Enterobius vermicularis</i> - <i>Strongyloides stercoralis</i> - <i>Ancylostoma duodenale</i> - <i>Necator americanus</i>
	Plathelminthes	Cestodes	- <i>Taenia saginata</i> - <i>Taenia solium</i> - <i>Hymenolypis nana</i> - <i>Diphyllobotrium latum</i>
Trématodes		- <i>Faciolopsis buski</i> - <i>Heterophyes heterophyes</i> - <i>Schistosoma sp</i>	

LES HELMINTHIASES INTESTINALES LES PLUS FREQUENTES :

II.1. Cestodes :

Ce sont des vers généralement hermaphrodites, dépourvus de tube digestif et ayant un corps segmenté : *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Hymenolepis nana* (Suzuki et al., 2013).

II.1.1. Téniasis -*Taenia solium*- :

II.1.1.2 Morphologie parasitaire :

- Forme adulte : Ver plat, segmenté, de 4 à 12 m de long, de couleur blanche. La tête ou scolex contient 4 ventouses sans rostre ni crochets. Ce scolex se prolonge par un cou de courte taille à partir duquel les segments croissent et se différencient. Par la suite, on retrouve un long strobile, composé de 1 000 à 2 000 segments ou proglottis, allant de 1 mm à 1 à 2 cm

pour les plus mûrs, en cours de maturité sexuelle, matures ou gravides. Ces derniers sont éliminés activement par l'anus.

- Œufs : sphériques, de 30 à 40 μm , dotés d'une paroi à double coque (une externe, hyaline et une interne de couleur marron, épaisse et striée et à l'intérieur de l'œuf, on trouve un embryon hexacanthé.

- Larve cysticerque : ovoïde, constituée par une enveloppe externe de collagène et un tissu interne fibro-musculaire qui renferme un scolex avec quatre ventouses.

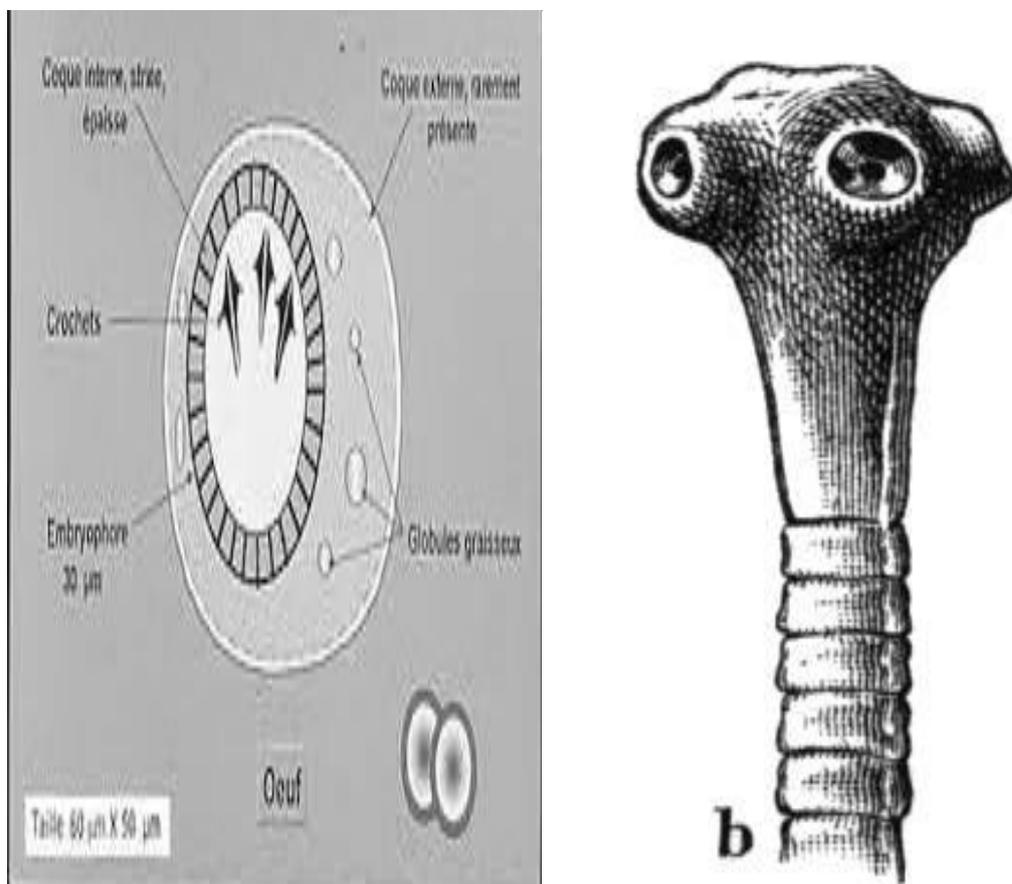


Figure. 6: Œuf de *Tænia* sp et scolex de *T. saginata*

II.1.1.3. Cycles évolutifs : *Tænia solium* :

C'est un ver plat dont les larves se trouvent dans la viande de porc. Sa taille varie de quelques millimètres à plusieurs mètres (3 m). Il présente, à son extrémité antérieure, un scolex muni de 4 ventouses proéminentes et de 700 à 1000 proglottis. Il possède 2 couronnes

crochets qui lui servent d'organes de fixation sur la muqueuse de l'intestin grêle. Il est exceptionnel et très rare dans les pays musulmans (Benouis., 2012 ; Gentilini., 2012).

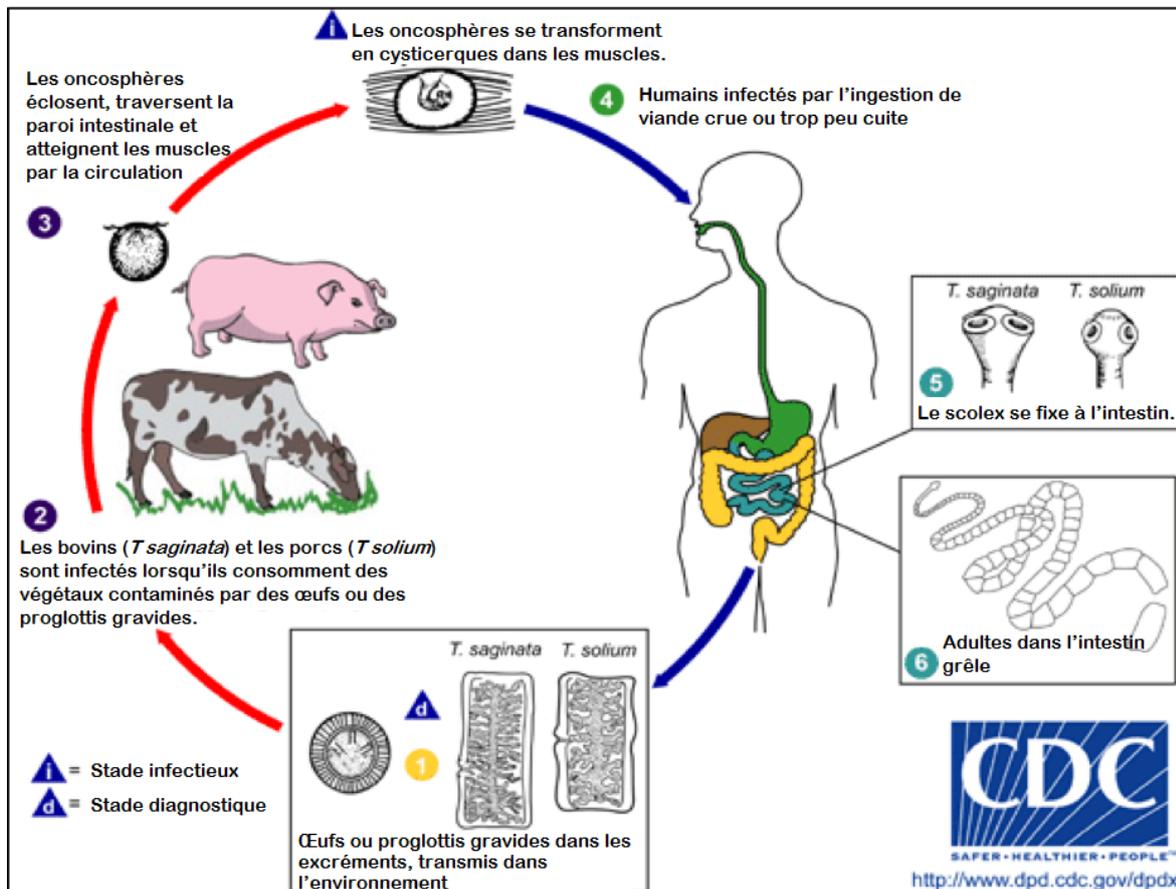


Figure . 7: Cycle évolutif de *T. saginata* et *T. solium* (Ito et al, 2016).

II.1.1.4. Symptômes:

Outre les cas fréquents asymptomatiques, l'infestation peut se manifester de façon polymorphe, les troubles étant rassemblés sous le nom de « téniasis ». Les patients se plaignent de douleurs abdominales, de troubles du transit, d'une anorexie, plus fréquente que la classique boulimie, de troubles du comportement, parfois de réactions allergiques (prurit, urticaire) et d'une certaine asthénie, Une occlusion intestinale est possible. (Guiguen, 2012).

II.1.1.5. Épidémiologie :

T. saginata est un parasite cosmopolite. L'Amérique latine, l'Afrique, le Moyen- Orient et l'Asie centrale sont des régions de haute endémicité. (Eichenberger , Dermauw, 2020)

II.1.1.6. Mode de transmission :

La contamination de l'Homme (hôte définitif) se fait par ingestion de viande de bœuf (hôte intermédiaire) contaminée, crue ou mal cuite, contenant des larves cysticerques.

II.2. Nématodes :

II.2.1. Ascariose - *Ascaris lumbricoïdes* :

Il est le vecteur d'une maladie parasitaire spécifiquement humaine.

II.2.1.1. Morphologie parasitaire :

- **Forme adulte** : La femelle mesure 20 à 30 cm de long et 3 à 6 mm de diamètre, le mâle est plus court et plus mince, 15 à 20 cm de long et 2 à 4 mm de diamètre et possède généralement une extrémité arrière enroulée caractéristiques qui permettent de distinguer facilement les deux sexes. Ils sont de couleur rosâtre ou blanc jaunâtre.

- **Œuf** : ellipsoïde de couleur jaune brune, mesure 50 à 75 μm sur 40 à 60 μm . Constitué par une double enveloppe : une externe à surface mamelonné, et une interne claire, épaisse et lisse, entourant une masse embryonnaire centrale granuleuse de couleur jaunâtre.



Figure . 8 : *Ascaris (Ascaris lumbricoïdes)* femelle



Figure . 9 : *Ascaris* mâle (en coupe, vu au microscope, grossi 200x)



Figure . 10: Œufs (non embryonné et embryonné) et adultes d'*A. lumbricoides*.

II.2.1.2. Le cycle parasitaire :

La (Fig. 11) est monoxène et se déroule en deux phases distinctes : une phase de migration larvaire à travers les tissus et une phase d'établissement des adultes dans le tube digestif. L'infection chez l'homme survient par voie oro-fécale lors de l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, qui contiennent des œufs embryonnés d'*Ascaris*. Après l'éclosion dans le duodénum, les larves de premier stade sont libérées et peuvent migrer par voie sanguine jusqu'aux poumons, où elles deviennent matures. Elles retournent ensuite dans le système digestif par le biais de la déglutition réflexe après avoir remonté les voies respiratoires. Après environ deux mois, les adultes, de sexes séparés, sont solidement établis dans le duodénum.

À ce stade, ils peuvent se reproduire et produire des œufs non embryonnés très résistants qui sont excrétés dans l'environnement. Après maturation, ces œufs deviennent infectieux pour un nouvel hôte (Anofel ,2014) .

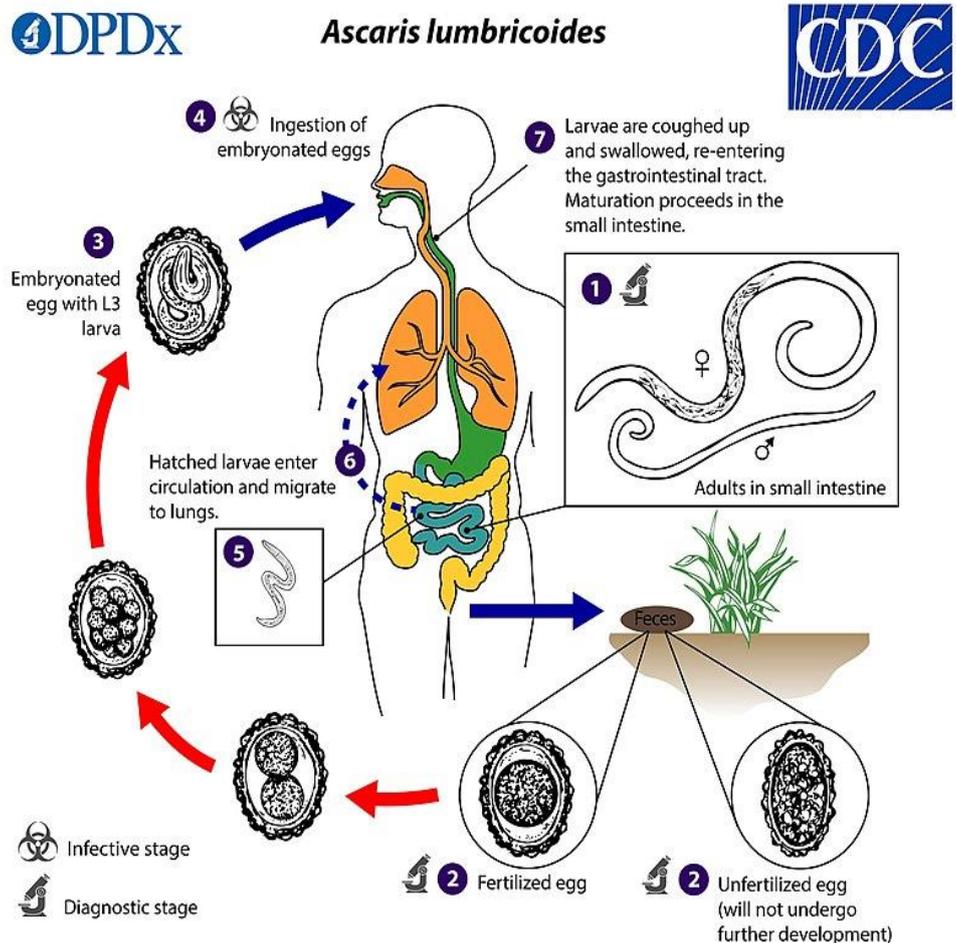


Figure . 11: Cycles évolutifs d'*Ascaris lumbricoides*.

II.2.1.3. Symptômes de l'infection par *Ascaris* :

Nausées et vomissements.

Diarrhée ou selles irrégulières.

Un blocage dans les intestins provoque de fortes douleurs dans la région abdominale.

Perte d'appétit.

Présence de vers visibles à l'œil dans les selles.

Gêne et douleur dans l'abdomen.

Perte de poids.

Croissance médiocre chez les enfants affectés en raison d'une mauvaise absorption des nutriments

II.2.1.4. Épidémiologie :

L'ascaridiose est l'helminthiase la plus répandue dans le monde. Selon une étude de l'OMS en 2008, on estime que plus de 980 millions de personnes dans le monde seraient parasitées par *A. lumbricoïdes*. Sa prévalence très élevée et l'endémicité sont principalement liées aux conditions socio-économiques . (Al-Tameemi , Kabakli, 2020)

II.2.1.5. Mode de transmission :

La transmission se fait par voie digestive par ingestion des légumes ou des aliments souillés.

Chapitre 02:

Techniques de Diagnostic des Parasites Intestinaux

Le diagnostic des parasitoses intestinales repose sur l'examen parasitologique des selles (EPS). Dans les cas d'amibiases, de flagelloses et de balantidiose, l'EPS permet de détecter la présence de trophozoïtes et de kystes. Les caractéristiques morphologiques décrites précédemment servent de critères d'identification. Pour les coccidioses, l'EPS doit être réalisé sur des échantillons frais et après une coloration spécifique, permettant d'observer les oocystes.

Le diagnostic des microsporidioses se fait par la recherche de spores dans les selles, utilisant une technique de coloration spécifique et/ou une coloration après concentration.

Le diagnostic parasitologique des helminthes repose sur la découverte du stade infestant dans les selles à l'aide de techniques spécifiques directes et complémentaires.(Benouis.A ,2012)

Le diagnostic certain d'une distomatose intestinale est établi par la détection directe des œufs operculés dans les selles, en tenant compte des arguments cliniques, épidémiologiques et des habitudes alimentaires (Jean-philippe colleta et *al*, 2012).

Le diagnostic d'une cestodose repose sur la présence de segments gravides ou d'embryophores.(Patrice bourée,2012).

Le diagnostic d'une infection par un nématode repose sur la découverte des différents stades parasitaires (œuf, larve et ver adulte). (Guillaume desoubieux et *al*, 2012).

De manière générale dans les maladies infectieuses, il existe deux grands types de techniques diagnostiques. Les méthodes directes qui cherchent à détecter le pathogène responsable (diagnostic morphologique, observation microscopique, détection d'antigène, détection d'ADN) et les techniques indirectes qui mettent en évidence la réponse de l'hôte (recherche d'anticorps).

I.1. Diagnostic clinique :

Les syndromes vermineux comportent une série des manifestations non spécifiques permettant d'orienter le diagnostic : toux, sialorrhée nocturne, constipation, nausée,

vomissement, diarrhée associée à des douleurs abdominales.

Des manifestations allergiques allant du prurit à l'œdème de Quincke peuvent également être signalées (Nimo, 2008).

I.2. Diagnostic parasitologique et conférence par examen parasitologie spécifique des selles :

I.2.1. Examen macroscopique :

Il consiste à étudier les caractères organoleptiques : la couleur, la consistance (liquide en bouse, fécale, pâteuse, moulée), les éléments surajoutés (mucus, glaire, sang) et la présence d'éléments nutritionnel macroscopiquement visibles et non mastiqués.

Il est recommandé d'observer la surface des selles pour rechercher la présence de parasites adultes tels que les femelles oxyures qui après fécondation, migrent au niveau de la marge anale (Thivierge, 2014).

II. Examen microscopique :

Les techniques de diagnostic microscopique des parasites intestinaux consistent à examiner des échantillons biologiques (surtout des selles) pour identifier directement les parasites, leurs œufs, larves ou formes végétatives. Voici un récapitulatif des principales techniques utilisées .

II.1. Examen microscopique direct sans concentration :

- Réalisé rapidement avec des selles fraîches pour conserver la vitalité des parasites.

Procédure :

- Une petite quantité de selles est diluée avec une goutte de solution saline (pour observer les formes mobiles) ou de solution Lugol (pour mieux visualiser les structures).

- La préparation est examinée sous faible (10x) et fort grossissement (40x) au microscope.

Objectif :

Identifier les formes végétatives (protozoaires) ou mobiles (larves d'helminthes) et les kystes .

II.2. Examen microscopique après concentration :

- Utilisé pour les échantillons où les parasites qui sont présents en faible quantité.

Méthodes principales :

Méthode de sédimentation :

Les parasites sont isolés au fond après centrifugation, comme dans la méthode de Ritchie. Utile pour les œufs et kystes.

Méthode de flottation :

Les parasites flottent en surface dans un liquide de densité supérieure (par exemple, solution saturée de NaCl dans la technique de Willis).

- Ces techniques augmentent la chance d'identifier les œufs et kystes en diluant les résidus .

III. Techniques de diagnostic moléculaire :

Les méthodes d'extraction des acides nucléiques sont essentielles à la biologie moléculaire et sont couramment utilisés dans de nombreuses applications des sciences médicales et biologiques (exemples étude de cancer, science des médicaments, diagnostic des maladies, diabétologie, infectiologie, neuropathologie, épidémiologie, hépatologie, cardiologie,..) (Perron, 2007).

Les étapes majeures de l'extraction de l'ADN ou ARN sont :

- **Lyse cellulaire** : par un détergent qui permet la lyse des cellules en dissolvant les membranes cellulaires et en débarrassant l'ADN d'une partie de protéines liées, il est ainsi libéré.
- **Isolement de l'ADN ou l'ARN** : sur colonne de silice ou par centrifugation différentielle.
- **Purification** : élution de la colonne après élimination des protéines et autres contaminants.
- **Contrôle qualité (optionnel)** : dosage par spectrophotométrie ou visualisation du profil électrophorétique sur gel d'agarose (Douablin, 2017).

III.1. Polymérase Chain Réaction (PCR) :

La PCR (Polymérase Chain Réaction) est, depuis sa mise au point en 1985 par *Saiki* et ses collaborateurs, la technique de base de la biologie moléculaire : elle permet à la fois de cibler le ou les fragments que l'on veut étudier. Elle est utilisée dans tous les types d'application.

La technique de PCR permet d'obtenir des copies multiples d'ADN à partir de quelques molécules d'ADN dites matrice à l'aide de la Taq polymérase.

Cette technologie a donné lieu à de très nombreuses techniques de biologie moléculaire fournissant aussi bien des informations qualitatives que quantitatives lorsque l'ADN est en quantité trop faible pour être analysé ou utilisé dans des réactions d'hybridation avec des sondes nucléotidiques (Delpech, 2021).

III.1.1. Principe de la PCR

La PCR ou Polymérase Chain Réaction est une technique qui procède de l'amplification des acides nucléiques humains ou exogènes . Cette méthode d'amplification décrite en 1985, a valu à Kary Mullis, le prix Nobel de chimie en 1993. Elle repose sur la capacité d'une enzyme, une ADN polymérase, à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice.

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces (ou primer). Celles-ci sont constituées d'un segment de 17 à 30 bases d'acide nucléique.

Leur association à l'ADN cible est suivie d'une élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin.

Cette amplification est répétée un certain nombre de fois afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée. (Delpech, 2021).

III.1.2. Les étapes de la PCR :

La PCR se compose de trois principales étapes, qui sont répétées de manière cyclique cible (Fig. 12) .

III.1.2.1. Dénaturation (95°C) :

La première étape consiste à chauffer l'échantillon d'ADN à une température élevée (environ 95°C) pour **dénaturer** l'ADN, c'est-à-dire séparer les deux brins de la double hélice d'ADN.

III.1.2.2. Hybridation (50-65°C) :

Après la dénaturation, la température est abaissée (entre 50°C et 65°C) pour permettre aux **amorces** (short oligo nucléotide primers) de se fixer spécifiquement sur les régions complémentaires à l'ADN cible. Les amorces sont des séquences courtes d'ADN qui délimitent la région à amplifier.

III.1.2.3. Elongation (72°C) :

À une température d'environ 72°C, l'enzyme **ADN polymérase** (souvent **Taq polymérase**) provenant commence à ajouter des nucléotides à partir des amorces, amplifiant ainsi le fragment d'ADN cible. Cette étape peut durer entre 30 secondes et quelques minutes, selon la taille de la région à amplifier.

Ces trois étapes sont répétées de nombreuses fois (généralement entre 20 et 40 cycles), ce qui entraîne une multiplication exponentielle du fragment d'ADN ciblé.

(Uhel et Zafrani, 2019).

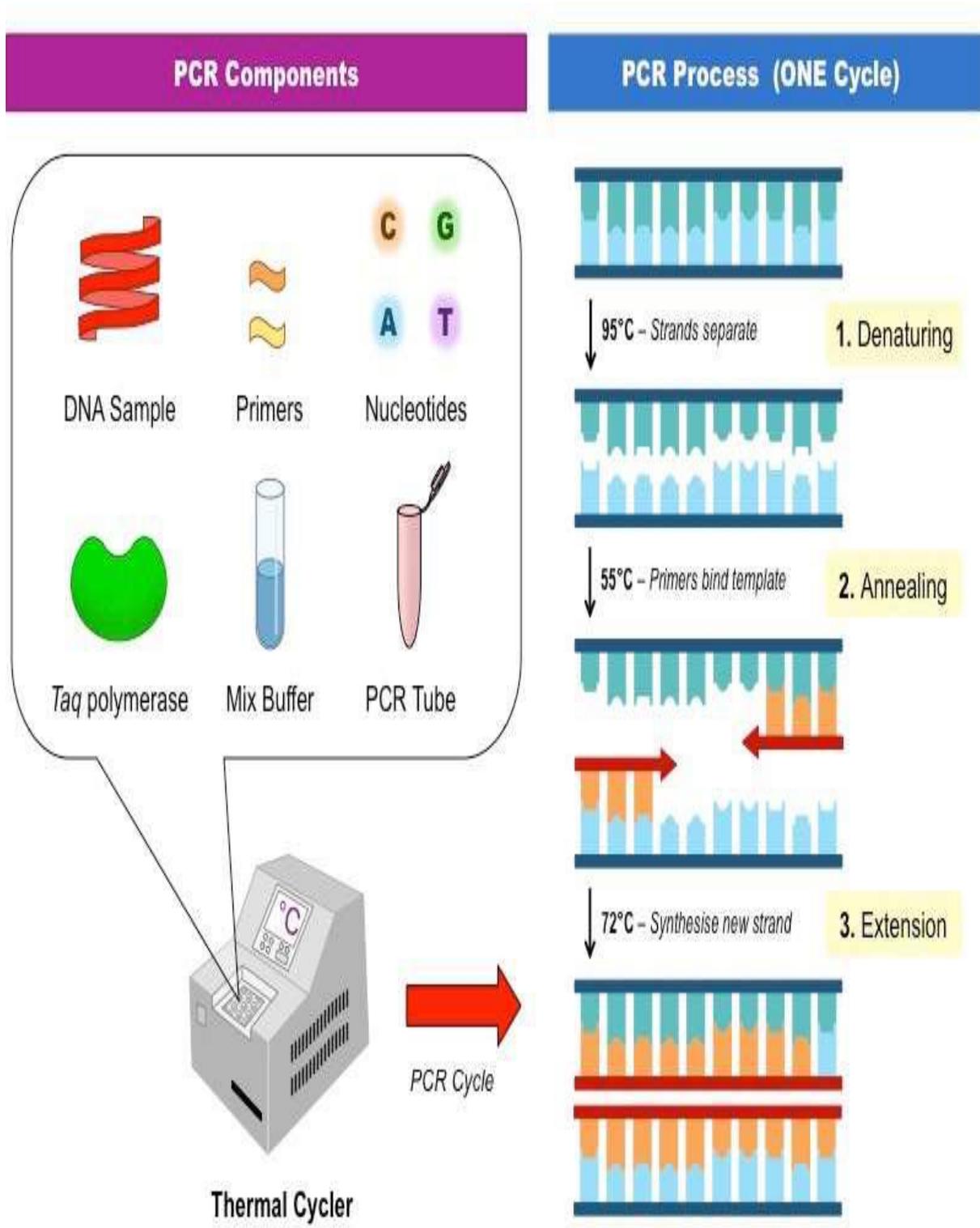


Figure . 12 : Les étapes de la PCR

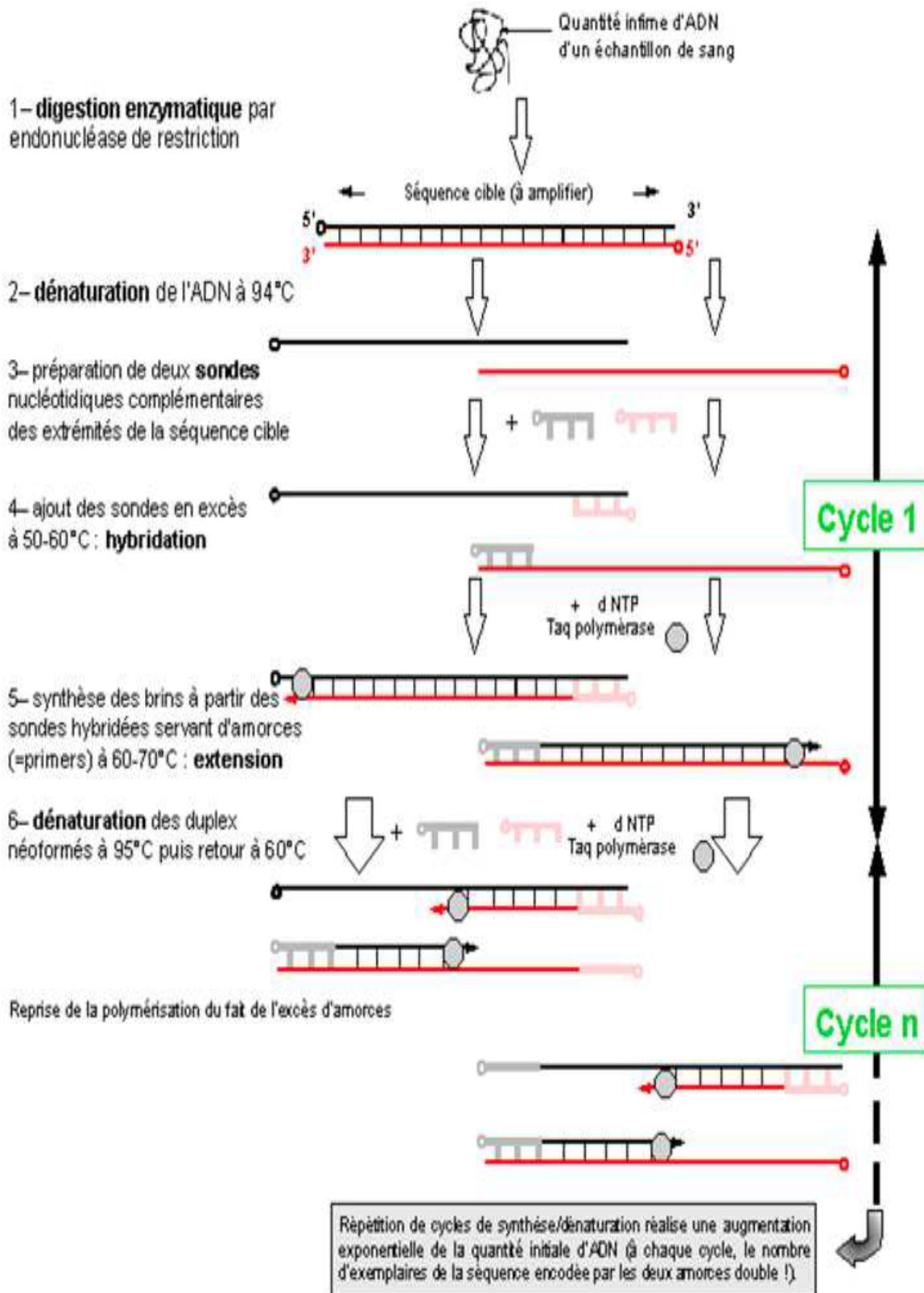


Figure . 13 : Technique de PCR classique (Gill et Ghaemi, 2008).

III.1.3. Avantages et limites de la PCR :

La PCR est utilisée dans une large gamme de domaines, y compris :

III.1.3.1 Diagnostic médicale :

Détection d'infections parasitaires, virales et bactériennes :

La PCR est utilisée pour diagnostiquer des infections comme celles causées par les *Plasmodium* (paludisme), *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, ainsi que de nombreuses infections virales (HIV, hépatite, etc.). (Borde *et al*, 2009).

III.1.3.1.1. Génétique et biologie moléculaire :

Analyse de gènes spécifiques :

La PCR peut être utilisée pour étudier des gènes ou des mutations particulières, comme dans le cadre des tests génétiques ou des recherches sur les maladies génétiques. (Chelli *et al*, 2008).

Clonage génétique :

Amplification d'un gène d'intérêt pour l'introduire dans une autre cellule (par exemple, dans le cadre des recherches en biotechnologie).

III.1.3.1.2. Médecine légale :

Identification par ADN :

La PCR permet d'amplifier l'ADN à partir de très petites quantités de matériel biologique (cheveux, salive, sang) pour effectuer des tests d'identification, par exemple dans les enquêtes criminelles. (Szelechowski et Saïb, 2005).

III.1.3.1.3. Recherche en écologie et évolution :

Étude de la biodiversité :

Identification des espèces à partir d'ADN environnemental, comme dans le cas des analyses de biodiversité, en utilisant des échantillons d'eau, de sol ou d'air. (Hejazian *et al*, 2015).

III.1.3.1.4. Tests de paternités :

Amplification et comparaison des segments d'ADN pour déterminer la relation biologique entre un parent et un enfant.

Avantages de la PCR :

- **Sensibilité** : La PCR permet de détecter des quantités minimales d'ADN ou d'ARN, ce qui est particulièrement utile pour diagnostiquer des infections à faible charge parasitaire ou virale.
- **Précision** : Grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques, la PCR peut cibler avec une grande précision des fragments génétiques très particuliers.
- **Rapidité** : La PCR peut être réalisée en quelques heures seulement, offrant ainsi un diagnostic rapide.
- **Polyvalence** : La PCR peut être utilisée sur une variété d'échantillons biologiques et pour détecter une grande diversité de pathogènes ou de mutations.

Limites de la PCR :

- **Coût** : Le matériel et les réactifs nécessaires à la PCR peuvent être coûteux, bien que des alternatives plus économiques soient apparues.
- **Contamination** : La PCR est très sensible aux contaminations par des traces d'ADN étrangères, ce qui peut fausser les résultats.
- **Nécessité d'équipement spécialisé** : La PCR nécessite un thermocycleur et des conditions de laboratoire spécifiques, ce qui peut limiter son accessibilité dans des contextes moins équipés.

III.1.4. Exemples de parasites identifiables par PCR :

Voici quelques exemples de **parasites intestinaux** qui peuvent être identifiés par PCR :

III.1.4.1. *Giardia lamblia* (ou *Giardia intestinalis*) :

- **Maladie** : Giardiose

- **Symptômes** : Diarrhée, douleurs abdominales, ballonnements, nausées.
- **Avantages de la PCR** : La PCR permet de détecter *Giardia* même lorsque les symptômes sont légers ou les œufs difficilement visibles au microscope.

III.1.4.2. *Entamoeba histolytica* :

- **Maladie** : Amibiase
- **Symptômes** : Diarrhée sanglante, douleurs abdominales, dysenterie.
- **Avantages de la PCR** : La PCR permet de distinguer *E. histolytica* pathogène de son proche parent non pathogène, *Entamoeba dispar*, ce qui est essentiel pour un diagnostic précis..

III.1.4.3. *Taenia spp. (Ténias)* :

- **Maladie** : Téniose
- **Symptômes** : Douleurs abdominales, perte de poids, présence d'œufs ou de segments dans les selles.
- **Avantages de la PCR** : La PCR peut identifier précisément l'espèce de *Taenia* (par exemple, *Taenia solium*, *Taenia saginata*), ce qui est essentiel pour la gestion des infections.

III.1.4.4. *Ascaris lumbricoides* :

- **Maladie** : Ascariose
- **Symptômes** : Douleurs abdominales, perte de poids, obstruction intestinale (dans les cas graves).
- **Avantages de la PCR** : La PCR peut détecter les œufs d'*Ascaris* dans les selles et peut être plus sensible que les méthodes classiques.

Partie Expérimentale

Chapitre 03 :

MATERIEL ET METHODES

Notre étude vise à comparer les performances d'un kit PCR multiplex avec d'autres méthodes de diagnostic existantes, telles que l'examen microscopique direct et les PCR simplex de routine, afin de déterminer sa sensibilité et sa spécificité pour détecter divers parasites intestinaux, notamment *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides*, et *Taenia saginata*.

I-Sélection des échantillons

Depuis l'année 2019, tous les échantillons de selles positifs pour au moins un parasite intestinal diagnostiqué au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IHU Méditerranée Infection). Ce diagnostic (Novodiag[®] Stool Parasite) a été établi soit par technique moléculaire (PCR routine simplex et/ou Bio Fire), soit par examen direct au microscope optique, soit par sérologie, soit des demandes associées à un contexte épidémiologique et clinique favorable. Cette étude a également inclus des positifs en prospectif dès lors qu'un nouveau cas positif était mis en évidence dans le cadre du diagnostic de routine du laboratoire. Une fois les patients sélectionnés, tout le panel disponible en PCR routine (Annexe 1) a été réalisé sur les échantillons : les patients sont classés dans le groupe « tests »

Pour constituer le groupe témoin négatif de cette étude, dix échantillons de selles provenant de donneurs de greffe fécale ont été inclus . Les patients ne doivent pas présenter de facteurs de risque d'être atteints de parasitoses intestinales (absence de voyage, personnes non migrantes, absence d'hyper éosinophilie sur le bilan biologique, absence de signes clinique évocateurs) . De plus, un dépistage d'agents infectieux est réalisé dans le sang et dans les selles .

Tous les échantillons ont été conservés dans des aliquotes congelés à – 80°C ou alors directement à partir du pot stérile primaire dans un congélateur à – 20°C.

Le jour de l'analyse par le kit Novo Diag[®] Stool Parasite, les selles ont été décongelées pour analyse *de novo* en test PCR routine (comprenant extraction d'ADN et PCR proprement dite) en parallèle au test Novo Diag[®] Stool Parasite. (Marceau tanguy, 2021).

II- Fonctionnement général du test Novo Diag[®] Stool Parasite :

Novodiag[®] Stool Parasites est un test de diagnostic moléculaire *in vitro* qualitatif et

automatisé permettant de détecter la présence de marqueurs d'acides nucléiques de trente pathogènes parasitaires et fongiques intestinaux: protozoaires, helminthes et micro sporidies les plus courants dans les échantillons de selles.

En combinant les technologies de PCR en temps réel et de puces à ADN, Novodiag[®] Stool Parasite permet l'analyse directe de l'échantillon d'un patient placé dans une cartouche à usage unique, pour un dépistage complet de pathogènes multiples. Vingt-six cibles sont analysées dans un même run.

Les résultats sont exprimés de manière qualitative (positif ou négatif) pour chaque parasite. Il présente également l'avantage d'être relativement facile d'utilisation, et ne nécessite pas l'intervention d'un opérateur expérimenté. (Marceau tanguy, 2021).

III- Protocole d'analyse NOVODIAG[®] Stool Parasite :

Le protocole d'analyse a été établi par le fournisseur.

Tout d'abord, la première étape consiste à prélever un échantillon de selle à l'aide d'un écouvillon. Cinq endroits différents ont été prélevés au sein d'un même échantillon, dans le but d'avoir une prise d'essai la plus homogène possible afin de pouvoir gagner en sensibilité (en raison du faible nombre de parasites présent dans certains cas).

Ensuite, l'écouvillon a été placé dans le milieu de transport fourni puis vortexé durant une dizaine de secondes. La totalité du contenu a ensuite été transféré dans un tube stérile contenant des billes en céramique, lui aussi fourni par Novodiag[®] Stool Parasite, puis placé dans un automate de type FastPrep, pour une durée de 90 secondes à 7 000 tours/min.

Enfin, 600 microlitres de solution finale ont été prélevés pour être déposés directement dans la cassette Novodiag[®] Stool Parasite.

A noter que le jour de décongélation de la selle pour l'analyse, un échantillon a été envoyé en parallèle pour réaliser une nouvelle extraction de matériel génétique en routine. Cela a permis de s'affranchir du « biais de congélation/décongélation », et ainsi éviter un faux négatif. (Marceau tanguy, 2021).

IV- PCR simplex routine :

La PCR simplex et le test NOVODIAG® Stool Parasite sont deux méthodes de diagnostic moléculaire qui, bien que partageant l'objectif de détecter des agents pathogènes, diffèrent significativement dans leur portée, leur technologie, leur rapidité et leur application clinique. La PCR simplex, en général, est plus polyvalente et peut être adaptée à la détection d'une large gamme de pathogènes, tandis que NOVODIAG® Stool Parasite est spécifiquement conçu pour la détection de parasites intestinaux.

(Calderaro A et al ; 2021, Vermeulen N et al,2022 ; Mühl H et al, 2020).

Ensuite, un ensemble de PCR simplex sur ces nouveaux extraits ont été réalisés. . L'ensemble des PCR dont le laboratoire sont listés dans l'Annexe 2

Tableau 3 : récapitulatif de la différence entre la PCR de routine et la PCR par le kit NovoDiag® Stool Parasite .(Vane lint et al , 2013).

Critère	PCR de routine (simplex)	PCR NovoDiag® Stool Parasite
Type de PCR	PCR simplex : détection d'un seul parasite par réaction.	PCR multiplex : détection simultanée de 26 cibles (30 pathogènes).
Automatisation	Manuel (extraction d'ADN et PCR séparées).	Entièrement automatisée : intégration de l'extraction, amplification et détection dans une cartouche.
Technologie	PCR classique ou en temps réel.	Combine PCR en temps réel et microarrays (puces à ADN) pour une détection multi-cibles.
Résultats	Qualitatif ou semi-quantitatif.	Qualitatif uniquement (positif/négatif).
Cibles	Spécifique à un parasite (ex. <i>Giardia</i> seul).	Panel large incluant protozoaires, helminthes, microsporidies.
Temps d'analyse	Long (étapes manuelles).	Rapide (environ 2-3 heures pour un résultat complet).

Chapitre 04 :

Résultats

Résultats :

Au final trente-six échantillons ont été analysés par PCR multiplex Novo Diag[®] Stool Parasite, dix témoins négatifs et vingt-six patients tests.

Les résultats par parasites recherchés par le système Novo Diag[®] sont détaillés individuellement ci-dessous et résumé dans le tableau 4.(Jana pipiková et *al*,2017) .

I- *Ascaris lumbricoides* :

Une selle positive à *Ascaris lumbricoides*, après examen direct microscopique a été incluse. La PCR Novo Diag[®] Stool Parasite a confirmé le résultat obtenu, tout comme la PCR de routine.

II- *Entamoeba histolytica* :

En ce qui concerne *E. histolytica*, les résultats sont plus contrastés.

Cinq échantillons positifs par PCR routine ont été inclus . Parmi eux, quatre étaient également positifs à l'examen direct, avec présence de formes kystiques pour les trois échantillons, et présence de formes kystique et végétative pour un échantillon .

Aucun de ces cinq échantillons n'a été confirmé par le kit Novo Diag[®] Stool Parasite. La PCR routine réalisée sur le nouvel extrait d'ADN contemporain au test Novo Diag[®] Stool Parasite est bien revenu positive pour les cinq échantillons.

III- *Giardia intestinalis*

Huit prélèvements ont été inclus. Quatre ont été diagnostiqués par PCR routine et quatre par PCR multiplex par le kit Gastro-intestinal Panel Film Array[®] du Bio Fire. L'EPS a pu être réalisé sur sept de ces échantillons : six étaient positifs (kystes ± formes végétatives) .

Après analyse dans le Novo Diag[®] Stool Parasite, sept échantillons sur huit ont détectés la présence de *Giardia intestinalis*.

IV- *Taenia saginata* :

Un cas de *Taenia saginata* a été inclus après visualisation d'œufs et d'anneaux sur l'examen direct des selles et une PCR routine positive. Cet échantillon a été confirmé par le Novo Diag[®] Stool Parasite *Taenia saginata/Taenia asiatica*.

Tableau 4 : Synthèse des résultats obtenus après analyse par le kit Novo Diag[®] StoolParasite (Marceau tanguy, 2021) .

Parasites	Nombre de positifs sur 36 échantillons			
	Examen direct	PCR routine	PCR du Gastrointestinal Panel Film Array [®] Bio Fire	Novodiag [®] Stool Parasite
<i>Ascaris lumbricoïdes</i>	1	1	ND	1
<i>Blastocystis spp</i>	3	14	ND	14
<i>Cryptosporidium spp</i>	0	1	0	1
<i>Dientamoeba fragilis</i>	0	6	ND	5
<i>Entamoeba histolytica</i>	4	5	0	0
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	0	1	ND	1
<i>Giardia intestinalis</i>	6	4	4	7
<i>Schistosoma mansoni</i>	1	1	ND	1
<i>Schistosoma spp.</i>	0	0	ND	1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	2	ND	0
<i>Taenia saginata</i>	1	1	ND	1

ND : non disponible dans le panel .

DISCUSSION ET CONCLUSION

Discussion général :

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'efficacité de la technique de PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) pour l'identification des parasites intestinaux chez l'homme, en utilisant spécifiquement le kit NovoDiag® Stool Parasite. Le test Novo Diag® Stool Parasite permettrait de gagner du temps au niveau de la technique des examens parasitologique des selles et ainsi pouvoir rendre les résultats de manière plus rapide environ 1 heure et demie et de façon plus exhaustive.

En termes de sensibilité et spécificité diagnostique, il est nécessaire que le test Novo Diag® Stool Parasite soit au moins aussi performant que les techniques par PCR simplex dont nous disposons en routine.

L'un des premiers points faibles du kit Novo Diag® Stool Parasite est d'exprimer ses résultats uniquement de manière qualitative (positif ou négatif) et de ne pas pouvoir avoir accès à des valeurs quantitatives. (Jingyun zhang et *al*,2019).

Les résultats très décevants pour *Entamoeba histolytica* posent un vrai problème diagnostic, de par la fréquence relative de l'amibiase et sa potentielle gravité. En effet, *E. histolytica* est le protozoaire le plus fréquent à travers le monde, avec 500 millions de cas.

Il est également responsable de 100 000 décès chaque année. Le diagnostic d'une amibiase colique est primordial chez les patients présentant des symptômes dysentériques mais aussi chez les porteurs asymptomatiques. Cette phase colique peut malheureusement évoluer vers la forme compliquée tissulaire. (Zhaohui Cui et *al*,1019).

Les résultats étaient plutôt convaincants. Cependant il est connu que certains protozoaires sous leurs formes kystiques n'ont pas la même facilité à être détruit au cours de l'étape d'extraction du matériel génétique. Pourtant dans notre activité de routine, c'est avec le parasite *G. intestinalis* que nous avons le plus souvent des problèmes d'extraction. (Guillaume ,2007) .

Gastro-intestinal Panel Film Array® est un autre kit diagnostic comprenant entre autre *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*. Lorsque l'on regarde les publications concernant

la sensibilité et la spécificité d'*Entamoeba histolytica*, peu de données sont disponibles. (Sarah n. buss et al,2015) .

En effet, cinq études étudiant la sensibilité globale du Gastro-intestinal Panel Film Array[®] n'ont pas eu d'échantillons positifs à *E. histolytica* à inclure, ou alors un seul positif dans leur cohorte de 462 selles . (Julian d. machiels et al,2020 , Zhifei zhan et al,2020 , Stacy g. beal et al, 2018 , Melissa o'neal et al,2020) .

Quatre selles étaient positives à *Entamoeba histolytica* avec un système PCR commercialisé, l'Ampli diag[®] Stool Parasites. Parmi elles, 2 selles correspondant aux charges parasitaires les plus fortes (et dont une présentait des kystes d'*Entamoeba histolytica/dispar* à l'examen direct), ont été correctement détectées en Novodiag[®] Stool Parasites. Les 2 autres selles avec une charge parasitaire moins élevées n'ont pas été détectées sur Novodiag[®] Stool Parasites. Elles étaient, par ailleurs, aussi négatives en microscopie : soit une sensibilité de 50%. a la différence de cette étude. (Florie barba, 2020) .

Une première étude espagnole publiée en 2019 par Paulos et al.(Silvia paulos et al,2019) vise à comparer les performances diagnostiques de quatre kits commerciaux pour la détection de protozoaires par des PCR multiplexé. Ils ont analysé de manière rétrospective 126 échantillons caractérisé par PCR : *Cryptosporidium hominis* (n = 29), *Cryptosporidium parvum* (n = 3), *Giardia duodenalis* (n = 47), *Entamoeba histolytica* (n = 3), autres parasites (n = 20) et non malades (n = 24). Gastroenteritis/Parasite Panel I (Diagenode) est un kit commercial comprenant *G. intestinalis*, *E. histolytica* et *Cryptosporidium spp.* la sensibilité est de 75% pour *Cryptosporidium spp.*, de 68.1% pour *Giardia intestinalis* et pas de positifs pour *E. histolytica* sur trois échantillons analysés. Le deuxième kit évalué est : RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel (R-Biopharm). Il comprend *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium spp* et *D. fragilis*. La sensibilité est de 87.5% pour *Cryptosporidium spp.*, de 78.7% pour *Giardia intestinalis* et 66.7% pour *E. histolytica*. Le troisième kit évalué est : Allplex Gastrointestinal Parasite (Seegene). Il comprend *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* et *Giardia intestinalis*. La sensibilité est de 78.1% pour *Cryptosporidium spp.*, de 91.5% pour *Giardia intestinalis*.et 100% pour *E. histolytica*. Le dernier kit évalué est : FTD Stool Parasites (Fast Track). Il comprend *G. intestinalis*, *E. histolytica* et *Cryptosporidium spp*. La sensibilité est de 53.1% pour *Cryptosporidium spp*, de 100% pour *Giardia intestinalis*.et 66.7% pour *E.histolytica*.

Une deuxième étude rennaise publiée en 2018 par Autier *et al* (Brice Autier *et al*,2018) a évalué la sensibilité de trois kit commerciaux pour le diagnostic de protozoaires intestinaux. 90 échantillons de selles positifs par microscopies ont été inclus. Le premier kit évalué est : BD MAX™ Enteric Parasite Panel. Il comprend *G. intestinalis*, *E. histolytica* et *Cryptosporidium spp.* Pour *G. intestinalis*, la sensibilité est de 89% (39/44). Pour *Cryptosporidium spp.* la sensibilité est de 55% (6/11). Le deuxième kit évalué est : RIDA®GENE Parasitic Stool Panel (R-Biopharm). Pour *G. intestinalis*, la sensibilité est de 41% (18/44). Pour *Cryptosporidium spp.* la sensibilité est de 100% (11/11). Pour *D. fragilis*, la sensibilité est de 71% (20/28). Gastroenteritis/Parasite Panel I (Diagenode) est le troisième kit évalué. Pour *G. intestinalis*, la sensibilité est de 64% (28/44). Pour *Cryptosporidium spp.* la sensibilité est de 73% (8/11) La sensibilité pour *E. histolytica*.

Une troisième étude publiée en 2019 par Jaeun *et al* (Jaeun Yoo *et al*,2019) a identifié 275 selles positives sur 858 et a étudié la sensibilité de trois kits commerciaux (Allplex Gastro-intestinal Parasite , Luminex xTAG Gastro-intestinal Pathogène Panel et BD MAX™ Enteric Parasite Panel). Malheureusement, un seul parasite (*Cryptosporidium*) a été retrouvé sur l'ensemble des échantillons.

Au final, la synthèse de ces études montre une sensibilité des kits PCR commercialisés pour *E. histolytica* multiplexé à d'autres protozoaires variant de 0% à 66.7%.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les variations de sensibilité d'une technique à l'autre:

- 1) la conception des amorces. En effet, les amorces du NovoDiag® peuvent être moins efficaces pour certaines souches comme *Entamoeba histolytica*, contrairement à des PCR simplex optimisées pour des cibles spécifiques. Le NovoDiag® a échoué à détecter *E. histolytica* (0/5), alors que la PCR routine était positive, 2) l'efficacité de l'extraction d'ADN : le protocole NovoDiag® (automate FastPrep + billes en céramique) peut moins bien lyser les kystes résistants (exemple *Giardia*), expliquant une sensibilité de 87.5% *versus* 100% pour *Ascaris*,3) les inhibiteurs dans les selles : les selles contiennent des inhibiteurs de PCR (bile, polysaccharides) qui interfèrent davantage avec les kits multiplex, réduisant la sensibilité,4) la charge parasitaire : le NovoDiag® peut manquer des infections à faible charge parasitaire, tandis que la microscopie ou PCR simplex (plus ciblée) les détecte, 5) les différences technologiques : la PCR routine utilise des protocoles validés pour des pathogènes spécifiques, tandis que le NovoDiag® sacrifie parfois la sensibilité pour couvrir un large panel.

2) Les raisons techniques des échecs de détection de certains parasites comme le cas d'*Entamoeba histolytica* (0% de détection avec NovoDiag®) peuvent être résumés comme suit: 1) les problèmes de conception des amorces : les amorces du kit ne ciblent pas efficacement le gène hémolysine d'*E. histolytica*, ou visent une région génomique variable. et le risque de réactivité croisée avec *Entamoeba dispar* (non pathogène); La dégradation de l'ADN : les échantillons ont été congelés/décongelés, ce qui pourrait endommager l'ADN parasite, surtout pour les protozoaires fragiles; 3) Les inhibiteurs résiduels : malgré l'étape FastPrep, des inhibiteurs pourraient persister et bloquer l'amplification de cibles faiblement représentées; 4) les limites du panel NovoDiag® : le kit ne détecte que 26 cibles, certaines souches ou variants génétiques d'*E. histolytica* pourraient être absents de la conception.

Conclusion

L'objectif de ce mémoire est d'évaluer l'efficacité de la technique de PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) pour l'identification des parasites intestinaux chez l'homme, en utilisant spécifiquement le kit NovoDiag® Stool Parasite.

Trente-six échantillons de selles ont été inclus, correspondant à vingt-six patients et dix témoins négatifs.

Le kit Novo Diag® Stool parasite a montré une excellente sensibilité (100%) pour les pathogènes suivants : *Ascaris lumbricoides*, *Blastocystis spp*, *Cryptosporidium spp*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Schistosoma mansoni* et *Taenia saginata* et une bonne sensibilité pour *Giardia intestinalis* (87.5%).

Concernant les *Entamoeba histolytica*, les résultats sont très décevants. Aucuns des échantillons positifs pour cette amibe n'a pu être confirmé par le kit Novo Diag® Stool Parasite.

Strongyloides stercoralis est l'autre parasite avec des résultats peu probants, puisque aucun des deux échantillons positifs analysés n'a été confirmé par le kit Novo Diag® Stool Parasite.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Al-tameemi, k.; kabakli, r.(2020).** *Ascaris lumbricoides*: Epidemiologie, Diagnostique, Traitement, et controle. *Asie journal de pharmaceutique et clinique recherche* ,p 8–11.
- Anofel,(2014).** Parasitologie médicale. Généralités et définitions Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie 2014, pp.12-40.
- Anofel ,(2022)** ,Parasitologie et Mycologie médicales . Elsevier Masson sas .
- Aubry P & Gaüzère b.a.(2018).** Parasitoses digestives dues à des nématodes Actualités
- Bastien.(2011).** Parasitologie. Généralités sur le parasitisme et les parasites. 5-7 p.
- Belkessa, s.; Elhosseyn, a.-s.; Laatamna, a.; Houali, k.; Sönksen, u.; Hakem, a.; Bouchene, z.; Ghalmi, f.; Stensvold, c. r.(2021).** Prevalence and Clinical Manifestations of *Giardia Intestinalis* and Other Intestinal Parasites in Children and Adults in Algeria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* , 104.
- Benouisi.a , (2012) :** Etude épidémiologique des parasitoses intestinales humaines dans la région d’Oran : Apport de techniques complémentaires à l’examen coprologique direct pour la confirmation du diagnostic. Mémoire de magister. Université d’Oran.
- Borde c, Maréchal v, Barnay-verdier s '(2009) .** Apport de la biologie moléculaire dans l’identification de nouveaux virus. *Revue Francophone Des Laboratoires*, (417) : 29-37.
- Botero, d. y Restrepo m.(1999).** Parasitosis Humana. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. 457 pp.
- Boudeffa rayan et Merabet amira (2021) .** "Etat des lieux de l’utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le domaine médical (CHU de Constantine et d’Annaba .
- Bourrée. p. (2001).** Aide mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale. Flammarion Médecine-sciences, Paris.
- Brice autier et al.(2018).** « Comparaison de trois commercial multiplex PCR assays de diagnostique protozoaire intestinale»,*Parasite* ,p2548,
- Calderaro a et al.(2021) .**"Evaluation of the NOVODIAG® Stool Parasites assay for the detection of intestinal *protozoa*." *Journal of Clinical Microbiology*.
- Chelli d, Dimassi k, Chaabouni m, Moez ben saad, Mssaed h, Bchir f , et al.(2008) .** Diagnostic anténatal de la trisomie 21 : expérience du service A du centre de maternité de Tunis *Semantic scholar* : 199-203.

Delepech m (2021) . La PCR un outil qui a mis la biologie moléculaire à la portée de tous les laboratoires d'analyse médicale. 205 :387-388.

Douablin alexandre.(2017) : Extraction d'ADN/ARN. BiomniGene. www.biomnigene.fr.

DURAND f., Brenier-Pinchart mp., Pelloux h.(2005). Parasitoses digestives : lambiase, téniasis, ascarirose, oxyurose, amibiase, hydatidose (100). Corpus médical – faculté de médecine de Grenoble.

Eichenberger, r. m.; Thomas, l. f.; Gabriël, s.; Bobić, b.; Devleeschauwer, b.; Robertson, l. j.; Saratsis, a.; Torgerson, p. r.; Braae, u. c.; Dermauw, v.(2020). Epidemiology of Taenia Saginata Taeniosis/Cysticercosis: A Systematic Review of the Distribution in East, Southeast and South Asia. Parasites & vectors , 13 (1), 1–11.

Farthing, m.j.g. (1998). *Giardia lamblia*. Dans: Gorbach, S.L., J.G. Bartlett et N.R. Blacklow, Infectious diseases. W.B. Saunders Company, pp.: 2339-2406.

Gentilini., (2012). Médecine tropicale. Ed Lavoisier, 1332 p, Paris. Parasitoses de l'eau ; Faculté des sciences DHER EL MEHREZ FES.

Gill , ghaemi .(2008) . Technologies d'amplification isotherme des acides nucléiques - Une revue.p226.

GUIGUEN c. (2012). Service parasitologie et zoologie Faculté de médecine 2, av. du Pr Léon-Bernard – CS 34317 35043 Rennes, Elsevier Masson SAS.

Guillaume.(2007). Parasitologie :Auto-évaluation, Manipulation. Edition Boeck,183p, Belgique.

Guillaume desoubeaux, jacques chandenier. (2012).Nématodes intestinales : aspects épidémiocliniques et diagnostic REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES N°440.

Hamimi meriem et Tas amel (2022)." Prévalence des principaux parasites intestinaux chez l'homme dans la région Blida .

Jana pipiková et al.,(2017) « Occurrence of the Most Common Helminth Infections among Children in the Eastern Slovak Republic », *Public Health* 150

Jaeun yoo et al.(2018). « Comparative Evaluation of Seegene Allplex Gastrointestinal,

Jean-philippe colleta, Sandra récopéa, Gilles dreyfussb, Marie-laure dardéa, (2022). Les distomatoses et leur diagnostic au laboratoire REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES N°440.

Luminex xtag (2019). Gastrointestinal Pathogen Panel, and BD MAX Enteric Assays for Detection of Gastrointestinal Pathogens in Clinical Stool Specimens », *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143, no 8: 999?1005, <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0002-OA>.

Jingyun zhang et al. (2019). « Evaluation of the BioFire Film Array Gastrointestinal Panel and Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of Major Diarrheagenic Pathogens by a Multicenter Diarrheal Disease Surveillance Program in China », *Foodborne Pathogens and Disease* 16, no 11: 788-798, <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2642>.

Julian d. machiels et al. (2020), « Impact of the BioFire Film Array Gastrointestinal Panel on Patient Care and Infection Control », éd. par Adriana Calderaro, *PLOS ONE* 15, n°2: e0228596, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228596>.

Khoualef tourya et Lechlache nesrine (2020) "Étude des parasites microscopique intestinaux dans les crudités consommées dans la ville d'Ain Témouchent ,

Magne d , Chochillon c, Savel jg . (1997) . Giardiose à *Giardia intestinalis* et autres flagelloles intestinales. *EncyclMédChir* (Elsevier, Paris), (50) : 1-6.

Marceau tanguy . (2021) : « Évaluation de la PCR multiplex NovoDiag Stool parasite dans le diagnostic des parasitoses intestinales chez l'homme » Thèse Présentée et publiquement soutenue devant la faculté des sciences médicales et paramédicales de marseille .

Melissa o'neal et al. (2020), « Evaluating Appropriateness and Diagnostic Stewardship Opportunities of Multiplex Polymerase Chain Reaction Gastrointestinal Testing within a Hospital System », *Therapeutic Advances in Infectious Disease* .

Mühl h et al (2020) . "Clinical performance of the NOVODIAG® Stool Parasites assay for rapid diagnosis of parasitic infections in a hospital setting." *Parasitology Research*,.

Nicolas x, Chevalier b, Simon f, Klotz f. (2001).Traitement des Parasitoses Intestinales (amibiases et mycoses exclues). *Encyclmedchir* (elsevier, paris), 60, 1-13.

Nimo ngbabo. S, (2008). Prévalence des parasitoses intestinales au C.S. Boyoma/Kisangani uniki – graduat. Rdc.

Olivier béréziat. (2004) " Application de la PCR en temps réel au diagnostic des candidémies. *Sciences du Vivant* .

Ouraiba i., Seghire n.(2014). Evaluation de la fréquence des parasitoses intestinales chez les enfants scolarisés. Département de pharmacie. Université abou bekr belkaid. Tlemcen. Pp. 3-89.

Perron karl. (2007) .Extraction des Acides nucléiques. BiOutils. www.bioutils.ch.

Ripert c.(2003) : Epidémiologie des maladies parasitaires Tome 1. Éditions médicales Inter- nationales. France. 393 p.

Sarah n. Buss et al. (2015). « Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis », éd. par C.-A. D .Burnham ,*Journal of Clinical Microbiology* 53, n° 3: 915-925,

Silvia paulos et al. (2019) . « Comparative Performance Evaluation of Four Commercial Multiplex Real-Time PCR Assays for the Detection of the Diarrhoea-Causing Protozoa *Cryptosporidium Hominis/Parvum*, *Giardia Duodenalis* and *Entamoeba histolytica* », éd. par Rodney D. Adam, PLOS ONE 14, no 4: e0215068,

Stacy g. Beal et al., (2018). « A Gastrointestinal PCR Panel Improves Clinical Management and Lowers Health Care Costs », éd. par Michael J. Loeffelholz, *Journal of Clinical Microbiology* 56, n° 1, <https://doi.org/10.1128/JCM.01457-17>.

Stanley, s. l. Amoebiasis..(2003), the lancet 361 (9362), 1025–1034. (03)12830-9.

Suzuki, c. t.-s. (2013). Automatic segmentation and classification of human intestinal parasites from microscopy images. Ieee trans biomed eng.

Szelechowski et a. Saïb.(2005) . Une nouvelle arme contre le cancer. Bilan sur les virus oncolytiques. Virologie. 9(4):261-271.

Thivierge K.(2014). Identification morphologique des parasites Intestinaux. Institut national de santé publique Québec. 3, 5, 11, 14, 23 p.

Vermeulen n et al.(2022) "Comparison of a routine multiplex PCR panel with NOVODIAG® Stool Parasites for gastrointestinal parasites: a prospective study." *Clinical Microbiology and Infection* .

Wéry m.(1995). Protozoologie médicale. International journal for parasitology. 17(2) :615-620

Uhel et Zafrani l.(2019) .Nouvelles techniques de biologie moléculaire. Méd Intensive Réa. 28(6) :464-472.

Van lint et al (2013) . étude utilisant une pcr multiplex en temps réel pour détecter Giardia lamblia , Cryptosporidium spp et Entamoeba hystolytica directe a partir d' échantillons de selles . acta clinica belgica

Wafa ibrahim.(2014) . " Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant la détection et le typage des entérovirus directement à partir de produits pathologiques ou d'échantillons environnement aux.Virologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne.

Zhaohui cui et al.(2019) , « Molecular Epidemiology, Evolution, and Phylogeny of *Entamoeba* Spp. », *Infection, Genetics and Evolution* .

Zeher bochra sirine et Keddar kheira(2024) "Les infections parasitaires intestinales au niveau de la wilaya de Relizane .

Zhifei zhan et al. (2020). « Comparison of BioFire Film Array Gastrointestinal Panel versus Luminex XTAG Gastrointestinal Pathogen Panel (XTAG GPP) for Diarrheal Pathogen Detection in China », *International Journal of Infectious Diseases* 99: 414-20,

Annexe 1 : Ensemble des PCR simplex disponible au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IHU Méditerranée Infection .

PCR du panel routine	PCR du Gastrointestinal Panel FilmArray® BioFire	PCR du kit NovoDiag® Stool Parasite
<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Ascaris lumbricoides/suum</i>
<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Balantidium coli</i>
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Blastocystis spp</i>
<i>Encephalitozoon</i>		<i>Clonorchis sinensis/Opisthorchis sp./Metorchis spp.</i>
<i>intestinalis</i>		<i>Cryptosporidium spp</i>
<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Cyclospora cayetanensis</i>
<i>Enterobius</i>		<i>Cytoisospora belli</i>
<i>vermicularis</i>		<i>Dientamoeba fragilis</i>
<i>bieneusi</i>		<i>Diphyllobothrium latum/nihonkaiense</i>
<i>Giardia intestinalis</i>		<i>Encephalitozoon spp.</i>
<i>Isoospora belli</i>		<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Necator</i>		<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
<i>americanus</i>		<i>Enterobius vermicularis</i>
<i>Schistosoma</i>		<i>Fasciola spp.</i>
<i>mansoni</i>		<i>Fasciolopsis buski</i>
<i>Strongyloides stercoralis</i>		<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Taenia saginata</i>		<i>Hymenolepsis diminuta</i>
<i>Taenia solium</i>		<i>Hymenolepsis nana</i>
<i>Trichuris trichura</i>		<i>Necator americanus</i>
		<i>Schistosoma mansoni</i>
		<i>Schistosoma spp.</i>
		<i>Strongyloides stercoralis</i>
		<i>Taenia saginata/asiatica</i>
		<i>Taenia solium</i>
		<i>Trichuris spp.</i>

Annexe 2 : Systèmes PCR disponibles au laboratoire de Parasitologie .

ORGANISMES CIBLES	GENES CIBLES	NOM	SEQUENCES (5'-3')
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>ITS-1</i>	Alum_F	GTAATAGCAGTCGGCGGTTTCTT
		Alum_R	GCCCAACATGCCACCTATTC
		Alum_T	6FAM- TTGGCGGACAATTGCATGCGAT
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Hemolysine</i>	Ehist_F	AAAGAACTTTGGAAAAAGAGTG
		Ehist_R	AAATGAAATAATTCTCTTGCTCT T
		Ehist_P	6FAM- AGCTTGAAAGAGTAATATGTGAA CGGA
<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Giardin</i>	<i>Giardia_F</i>	CGTGAAGATGATCAAGGAC
		<i>Giardia_R</i>	CTGGTTCTGGAGATTTGTCT
		<i>Giardia_P</i>	6FAM- AGGAGATCGACACCATGGCTGC
<i>Taenia solium</i>	<i>oncosphere protein gene</i>	<i>Tsol_F</i>	GCTCTGCAGGCCACCTATTTC
		<i>Tsol_R</i>	CTAGGGACTTGCGGAGAGTG
		<i>Tsol_P</i>	6FAM- GGAATGTGATCGGCTTGTCACA
<i>Taenia saginata</i>	<i>ITS</i>	<i>Tsag_ITS_F</i>	GCGTCGTCTTTGCGTTACAC
		<i>Tsag_ITS_R</i>	TGACACAACCGCGCTCTG
		<i>Tsag_ITS_P</i>	6FAM- TTGCTGCTGTCGCTGGTGCTGTGG

ITS : internal transcribed spacer ; SSU : Small sub units ; FAM 6 carboxyfluorescein,
MGB : minor groove binder.