

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2019

THESES 2019 TOU3 2072

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Audrey MAILLE

DETECTION MOLECULAIRE DES ESPECES D'*ENTAMOEB*A CHEZ LES
PATIENTS AYANT BENEFICIE D'UN EXAMEN PARASITOLOGIQUE DES SELLES
AU CHU DE TOULOUSE EN 2018-2019 : EVALUATION DE LA PREVALENCE ET
DES FACTEURS DE RISQUE ASSOCIES

Le 24 octobre 2019

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur IRIART Xavier

JURY

Président : Monsieur le Professeur VALENTIN Alexis
1er assesseur : Monsieur le Professeur BERRY Antoine
2ème assesseur : Monsieur le Professeur MARTIN-BLONDEL Guillaume
3ème assesseur : Monsieur le Docteur IRIART Xavier





**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} janvier 2019**

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERA EVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. OLICHON A.	Biochimie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Assistant Associé des Universités	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	Mme MARTINI H	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. METSU D.	Pharmacologie		
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S	Biophysique		

Remerciements

A Monsieur le Professeur VALENTIN Alexis, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier. Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury mais aussi pour l'enseignement apporté au cours de mes études à la faculté de pharmacie et en tant qu'interne au laboratoire de parasitologie-mycologie.

A Monsieur le Professeur BERRY Antoine, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier. Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de parasitologie-mycologie.

A Monsieur le Professeur MARTIN-BLONDEL Guillaume, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier. Je vous exprime mes remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury et pour y apporter votre expertise clinique.

A Monsieur le Docteur IRIART Xavier, Maître de Conférence des Universités et Praticien Hospitalier. Je t'exprime ma sincère gratitude pour m'avoir encadré durant ce travail. Ta disponibilité, ta rigueur et tes encouragements m'ont été d'une aide précieuse pour la réalisation de ce travail de thèse.

A toutes les équipes de techniciens, de biologistes, de secrétaires que j'ai eu la chance de rencontrer durant mes différents stages. Je tiens plus précisément à remercier l'équipe de techniciens de biologie moléculaire de parasitologie-mycologie, Julie, Elodie, Valérie et Allan. Votre bienveillance, votre expérience et votre aide ont été très précieuses et importantes pour la réussite de ce travail. Merci beaucoup Allan pour ton implication, ton travail, ton aide et ta disponibilité sans lesquels je n'aurais peut-être pas traité ce sujet. Je vous souhaite une très bonne continuation pour la suite.

A toute l'équipe du laboratoire de Millau. Aux biologistes, le Docteur DENOYES, le Docteur WEITZ et le Docteur JOMIER ; Aux techniciens Catia, Magalie, Hélène, Anaïs, Sylvie,

Fabienne, Martine, Liliane, Laeticia, Eve, Céline, Marie-Christine, Véronique, Irène, Adeline et Cyril et aux secrétaires Nathalie Cathy, Cathy, Gwenaëlle. Je vous remercie sincèrement pour m'avoir aussi bien accueilli et intégré dans votre équipe.

A tous mes co-internes de Limoges et de Toulouse avec qui j'ai partagé des moments inoubliables durant ces quatre années d'internat, j'en garde que des bons souvenirs. Merci à Pauline, Orancie, Elodie, Seb, Camille C, Julien, Laurie, Anthony C, Tiphaine, Grégoire, Etienne, Delphine, Aude, Tom, Pierre, Marine, Florence, Maximin, Jean, Imane, Thomas, Anaïs, Marion, Emeline, Agnès, Alizée, Vuthy, Bastien, Cécile, Jacques, Jules, Damien, Yolla, Léa, Nicolas, Sabine, Noémie, Karen, Samuel, Julian,...

Aux Belmontais. Merci pour votre bonne humeur, votre joie de vivre et pour tous ces bons moments indénombrables et festifs passés à vos côtés.

A Clémence, Tiphaine, Soraya. Que de choses à dire sur vous, des souvenirs pleins la tête qui commencent à s'accumuler depuis le lycée et ce n'est pas fini ! Des moments inoubliables dans la ville rose durant toutes ces années de vie étudiante. Merci pour tout, les copines. Je ne peux que vous souhaiter pleins de belles choses et de bonheurs.

A ma belle-famille. Mes beaux-parents, Guigui, Sylvain, Julia, Cédric et la petite Léonie (le petit rayon de soleil), merci pour votre bienveillance et votre soutien. Vous êtes une famille formidable.

A mes grands-parents Hubert et Marie-Louise. Même si l'on ne se voit pas souvent, je vous remercie pour votre gentillesse et votre soutien pendant toutes ces années.

A ma grand-mère Thérèse. Merci pour tout ce que tu apportes à cette famille, pour toutes tes attentions, nous pouvons tous t'en être que reconnaissant. Toutes mes pensées vont envers toi **Papy**, tu laisses un vide immense. Je suis sûre que tu aurais été fier de moi.

A tout le reste de la famille. A mes oncles et tantes, mes cousins et cousines. Je vous remercie pour tous les merveilleux moments passés à vos côtés. La famille est si précieuse.

A mes parents. Je vous suis éternellement reconnaissante pour tout le soutien que vous m'avez apporté. Vos encouragements et votre confiance ont été d'une aide importante tout au long de ces années d'études. Merci pour tout.

A Marie et Quentin. Je vous remercie pour votre soutien malgré la distance. Marie, ma grande sœur, depuis que nous sommes enfants, tu t'es occupée de moi. Tu as été un exemple pour moi, un modèle à suivre. Je ne te remercierai jamais assez pour ton écoute, ton soutien et ton aide durant les moments difficiles. On sera toujours là l'une pour l'autre.

Antonin. Tu as su me soutenir et m'encourager dans les moments difficiles. Je te suis éternellement reconnaissante pour ton soutien et ton aide si précieuse. Je sais que je pourrais toujours compter sur toi. Nous avons tellement de projets ensemble. Alors maintenant à nous l'avenir !

Table des matières

Table des matières	11
GLOSSAIRE	13
Table des illustrations.....	14
Table des tableaux.....	15
Introduction.....	17
Partie I - Revue de la littérature	19
I- Généralités sur le genre <i>Entamoeba</i>	19
I-1 Descriptions des différentes espèces et historique de leurs découvertes	19
I-2 Caractéristiques principales des différentes espèces d' <i>Entamoeba</i>	20
I-3 Taxonomie, phylogénie et spécificité d'hôtes.....	23
II- Pathogénicité des différentes espèces d' <i>Entamoeba</i>	25
II-1 Pathogénicité d' <i>E. histolytica</i>	25
II-2 Pathogénicité d' <i>E. moshkovskii</i> et d' <i>E. bangladeshi</i>	26
II-3 Pathogénicité des autres espèces	27
III-Description des différentes techniques pour le diagnostic des <i>Entamoeba</i>	28
III-1 La microscopie optique	28
III-2 Culture et analyse des isoenzymes	29
III-3 Détection d'antigènes	29
III-4 Sérologie.....	30
III-5 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	30
III-5-1 Extraction des acides nucléiques	30
III-5-2 PCR.....	31
III-5-3 Autres techniques	32
IV-Application des techniques en clinique ou à visée épidémiologique	33
IV-1 Application en clinique : Stratégie diagnostique	33
IV-2 Application à l'épidémiologie	33
V- Distributions et prévalences des différentes espèces du genre <i>Entamoeba</i>	35
V-1 Facteurs associés à la contamination humaine	35
V-2 Prévalence du complexe <i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> , <i>E. moshkovskii</i> et <i>E. bangladeshi</i>	36
V-3 Prévalence de <i>E. coli</i> , <i>E. hartmanni</i> , <i>E. polecki</i>	36
VI- Traitement	37
Partie II - Développement de la PCR <i>Entamoeba sp.</i>	39
I- Revue de la littérature	39
II- Choix de la séquence cible	42
III- Design des amorces.....	43

IV- Composition du milieu réactionnel et optimisation de la PCR	45
Partie III - Etude épidémiologique.....	49
I- Introduction	49
II- Matériels et méthode	50
II-1 Design de l'étude.....	50
II-2 Examen parasitologique des selles (EPS) standard	50
II-3 Pré-traitement et extraction de l'ADN.....	50
II-4 PCR <i>Entamoeba sp.</i>	51
II-5 Séquençage	51
II-6 Arbre phylogénétique	52
II-7 Recueil de données	52
II-8 Analyse statistique	53
III-Résultats.....	54
III-1 Détection des patients positifs en <i>Entamoeba sp.</i>	54
III-2 Comparaison des méthodes de détection	57
III-3 Résultats de l'étude cas/contrôle	57
III-3-1 Données démographiques.....	57
III-3-2 Co-infection parasitaires et/ou bactériennes associées	59
III-3-3 Résultats des données cliniques et biologiques	60
IV-Discussion	63
IV-1 Comparaison de la PCR <i>Entamoeba sp.</i> avec les autres techniques utilisées en routine dans le cadre de l'EPS	63
IV-2 Séquençage et phylogénie des <i>Entamoeba</i>	63
IV-3 Prévalence des <i>Entamoeba</i>	64
IV-4 Zones géographiques	66
IV-5 VIH / homosexualité masculine	67
IV-6 Signes cliniques et biologiques	69
IV-7 Points forts et points faibles de l'étude.....	69
Conclusions et perspectives	71
ANNEXE	72
Bibliographie	73

GLOSSAIRE

AN : Acide nucléique

Complexe Eh / Ed / Em / Eb : complexe *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* et *E. bangladeshi*

EPS : Examen parasitologique des selles

FV : Forme végétative

IC : Intervalle de confiance

IQR : Ecart interquartile

LC1 : LightCycler® 1.0

LC2 : LightCycler® 2.0

MO : microscopie optique

PCR : polymerase chain reaction

Pdb : paire de base

POCT : Point of care tests

OR : odds ratio

ST : sous-type

UE : Union Européenne

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Table des illustrations

- Figure 1 : Aspects des kystes et trophozoïtes des différentes espèces d'*Entamoeba sp.*
- Figure 2 : Schéma du cycle d'*E. histolytica*
- Figure 3 : Arbre phylogénétique d'*Entamoeba sp.* réalisé à partir de la sous-unité 18S
- Figure 4 : Arbre phylogénétique des séquences partielles de la sous-unité 18S représentant les variations intraspécifique pour *E. coli*
- Figure 5 : Résultats de la PCR conventionnelle après migration électrophorétique testés avec les amorces ENTAM 1 / 2
- Figure 6 : Alignement des séquences ENTAM 1 / 2 avec les séquences d'*Entamoeba sp.* et avec *Saccharomyces cerevisiae*
- Figure 7 : Alignement des séquences sens ENTAM 1 / RD5 / 542 décrit dans la littérature avec des séquences de différentes espèces d'*Entamoeba*
- Figure 8 : Alignement des séquences sens Eg-SS-F1 avec des séquences de différentes espèces d'*Entamoeba*
- Figure 9 : Alignement sur Bioedit des différentes séquences d'*Entamoeba* et d'autres espèces non *Entamoeba* après le design des amorces sens FOR1 et FOR2
- Figure 10 : Alignement sur Bioedit des différentes séquences d'*Entamoeba* et d'autres espèces non *Entamoeba* après le design de l'amorce anti-sens REV
- Figure 11 : Résultats des courbes de fusion représentant la dérivée seconde de la fluorescence (-dI/dT) en fonction de la température avec des conditions en MgCl₂ de 2mM et une température d'amplification de 68°C
- Figure 12 : Résultats des courbes de fusion représentant la dérivée seconde de la fluorescence (-dI/dT) en fonction de la température avec des conditions en MgCl₂ de 4mM et une température d'amplification de 68°C
- Figure 13 : Distribution des différentes espèces en fonction de l'âge des patients infectés par *Entamoeba sp.* (sauf *E. gingivalis*)
- Figure 14 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences partielles de l'ARN ribosomique
- Figure 15 : Nombre de patients masculins ou féminins en fonction de l'espèce d'*Entamoeba* détectée

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des trophozoïtes et des kystes des différentes espèces d'*Entamoeba*

Tableau 2 : Exemples des différentes amorces spécifiques d'*Entamoeba sp.* décrites dans la littérature

Tableau 3 : Numéro d'accèsion GenBank des différentes séquences d'*Entamoeba* utilisés pour le développement de la PCR *Entamoeba sp*

Tableau 4 : Caractéristiques principales des amorces FOR1, FOR2 et REV

Tableau 5 : Résultats des Ct d'*E. dispar* sur LC1 en fonction des concentrations en MgCl₂ et des températures d'hybridation

Tableau 6 : Résultats de la prévalence des différentes espèces d'*Entamoeba* déterminés avec la PCR *Entamoeba sp.*

Tableau 7 : Identification des différentes espèces d'*Entamoeba* selon les différentes techniques

Tableau 8 : Résultats de l'étude cas/contrôle

Introduction

Au cours de l'Histoire, les connaissances scientifiques concernant le genre *Entamoeba* ont été très intimement liées aux progrès techniques permettant leur détection et leur identification. La microscopie optique (MO), inventée durant le XVIème siècle et améliorée par Antoni van Leeuwenhoek au cours du XVIIème siècle, a été un des outils indispensable à l'origine de l'amélioration des connaissances en biologie [1]. Grâce à la MO, l'identification de la première amibe, *E. gingivalis* a pu être effectuée en 1849 [2]. L'avènement de la biologie moléculaire a entraîné une deuxième révolution dans le domaine du vivant. Née au XXème siècle, elle a connu un développement constant depuis les années 1970 et la première PCR *Entamoeba* date de 1992 [3]. Cet outil a permis en 2011, d'identifier la dernière espèce actuellement décrite chez l'Homme, *E. bangladeshi*. Durant les 160 ans séparant ces 2 découvertes, six autres espèces dans le genre *Entamoeba* ont été identifiées chez l'Homme (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. coli*, *E. polecki*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*).

Malgré son ancienneté, la MO reste la technique de référence pour la réalisation de l'examen parasitologique des selles (EPS). Elle est encore très utilisée du fait de son faible coût et de sa facilité d'utilisation. Cependant, elle présente un certain nombre d'inconvénients qui peuvent être en partie résolus par les techniques de biologie moléculaire, faisant de ces dernières, des outils très intéressants et performants pour approfondir les connaissances scientifiques au sein de ce genre, notamment dans le domaine de l'épidémiologie.

Du fait de sa pathogénicité, le nombre de publications concernant *E. histolytica*, est très important, à la différence des autres espèces d'*Entamoeba*, considérées comme non pathogènes, qui peuvent parfois apparaître comme des thématiques délaissées. Les *Entamoeba* sont surtout retrouvées dans les pays en développement ou les conditions d'hygiène et d'assainissement sont précaires. De ce fait, il existe peu d'études, à l'heure actuelle, sur la prévalence et les facteurs de risque associés aux infections par *Entamoeba sp.* dans les pays occidentaux.

L'ensemble de ces éléments nous a donc conduit à réaliser une étude épidémiologique basée sur des techniques moléculaires au sein du CHU de Toulouse de juillet 2018 à juillet 2019. Ce travail avait pour but de déterminer la prévalence des espèces d'*Entamoeba* et d'identifier les facteurs de risque associés à la détection digestive d'*Entamoeba*, chez les patients ayant bénéficié d'un examen parasitologique des selles.

Partie I - Revue de la littérature

I- Généralités sur le genre *Entamoeba*

I-1 Descriptions des différentes espèces et historique de leurs découvertes

Actuellement huit espèces dans le genre *Entamoeba* sont décrites chez l'homme :

- *Entamoeba histolytica*
- *Entamoeba dispar*
- *Entamoeba coli*
- *Entamoeba hartmanni*
- *Entamoeba polecki*
- *Entamoeba moshkovskii*
- *Entamoeba bangladeshi*
- *Entamoeba gingivalis*

E. gingivalis, est la première amibe décrite en 1849 par Gros dans du tartre dentaire [2]. Elle a ensuite été étudiée plus précisément en 1904 par Von Prowazek [4]. Elle présente des particularités qui la différencient des autres espèces. Seule la forme végétative (FV) est connue. Observée dans la cavité buccale, cette espèce participerait à la physiopathologie des parodontites [5]. Ce travail de thèse s'intéressant principalement aux espèces présentes au niveau intestinal, *E. gingivalis*, par conséquent, sera moins détaillée que les autres espèces.

En 1870, *E. coli* a été découvert par Lewis. Ce n'est que 33 ans plus tard, en 1903, que Schaudinn a décrit plus précisément ce protozoaire en signalant la présence de 8 noyaux dans le kyste mature de cette espèce [6].

E. histolytica a été décrite en 1875 par Fedor Aleksandrovich Lösch à partir des échantillons d'un patient atteint de dysenterie mortelle [7]. En 1890, Osler diagnostiqua pour la première fois un cas d'abcès amibien du foie. Un an plus tard Councilman et Lafleur, ont confirmé le rôle pathologique des amibes au moyen d'études sur des patients atteints de dysenterie et d'abcès du foie et ont introduit les termes de dysenterie amibienne et d'abcès hépatique amibien. Le nom d'*E. histolytica* a été formellement attribué par Schaudinn en 1903 [8].

En 1925, le parasitologue Brumpt suggère l'existence d'une autre espèce d'*Entamoeba* non pathogène mais morphologiquement identique à *E. histolytica* qu'il nomme *E. dispar*. Cette hypothèse a longtemps été réfutée par la communauté scientifique. Il a fallu attendre 1993 et le développement de techniques immunologique, biochimique et moléculaire pour que l'hypothèse de Brumpt soit acceptée et que les deux espèces soit séparées [9]. En 1997, l'OMS a publié un article recommandant de différencier ces deux espèces et de ne traiter que les patients infectés par *E. histolytica* [10].

En 1912, Prowazek décrit 3 stades pour *E. histolytica* dont une forme kystique plus petite, qui n'était jamais associée à des diarrhées dysentériques. Il pense que ce kyste ne correspond pas à *E. histolytica* mais à une nouvelle espèce qu'il nomme, *E. hartmanni*. En 1928, Brumpt a soutenu qu'*E. hartmanni* était une espèce distincte d'*E. histolytica* [11], ce qui a été confirmé plus tard.

En 1912, Von Prowazek a aussi identifié une autre espèce, *E. polecki*, dans des échantillons de selles de deux étudiants du Kampuchéa en Tchécoslovaquie [12]. Cette espèce a ensuite été retrouvée à plusieurs reprises dans des excréments de porc. Aucune autre description chez l'Homme n'a été faite avant 1949 [13].

E. moshkovskii a été découverte par Tshalaia en 1941 dans les eaux usées de Moscou [14]. Cette espèce a d'abord été décrite dans l'environnement. Ce n'est qu'en 1961 qu'elle a été identifiée chez un homme vivant au Texas qui présentait des diarrhées, une perte de poids et des douleurs épigastriques [15].

Beaucoup plus récemment, grâce aux développements des techniques de biologie moléculaire, une nouvelle espèce, *E. bangladeshi* a été décrite en 2011 chez des enfants au Bangladesh, comme son nom l'indique [17].

I-2 Caractéristiques principales des différentes espèces d'*Entamoeba*

Ces espèces (sauf *E. gingivalis*) peuvent résider dans la lumière intestinale de l'Homme et se présentent sous deux formes, une forme kystique et une forme végétative (FV) ou trophozoïtes (Figure 1) [18].

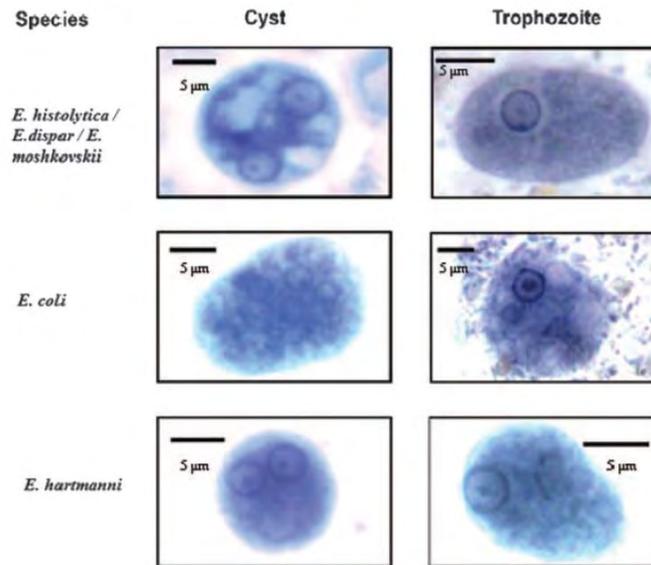


Figure 1 : Aspects des kystes et trophozoïtes des différentes espèces d'*Entamoeba* sp. [18]

Les caractéristiques microscopiques permettant de différencier les espèces sont détaillées dans le Tableau 1. La différenciation de ces espèces repose sur la taille de la FV ou du kyste, le nombre de noyaux, la disposition de la chromatine, la forme du caryosome et le contenu du cytoplasme [18].

Les espèces *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* et *E. bangladeshi* sont morphologiquement non différenciables mais génétiquement différentes [8]. Lorsque les données microscopiques sont uniquement présentes, on parle du complexe *Eh / Ed / Em / Eb*. Le kyste de ce complexe est caractérisé par une taille entre 10 et 15µm et la présence de 4 noyaux lorsqu'il est mature tandis que le kyste d'*E. polecki* fait la même taille mais ne présente qu'un seul noyau. Celui d'*E. hartmanni* est plus petit (6-8 µm) mais possède 4 noyaux. Enfin *E. coli* mesure 15-25µm et présente 8 noyaux et une paroi épaisse.

Tableau 1 : Caractéristiques des trophozoïtes et des kystes des différentes espèces d'*Entamoeba* [18]

Characteristics	<i>E. histolytica/E. dispar/ E. moshkovskii</i>	<i>E. hartmanni</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. polecki</i>
Size, nuclei, and motility				
Trophozoites	15–20 µm, 1 nucleus (difficult to see in unstained preparations), actively motile with finger shaped pseudopodia	8–10 µm, 1 nucleus (usually not seen in unstained prepn), usually unprogressive	20–25 µm, 1 nucleus (often visible in unstained prepn); sluggish, short, and blunt pseudopodia	15–20 µm, 1 nucleus (occasionally seen on wet prepn), sluggish
Cysts	10–15 µm, mature cyst with 4 nuclei, immature cyst has 1 or 2 nuclei (nuclear characters difficult to see on wet prepn)	6–8 µm, mature cyst with 4 nuclei, immature cyst has 1 or 2 nuclei, two nucleated cysts very common	15–25 µm, mature cyst has 8 nuclei, occasionally 16 or more nuclei	10–15 µm, mature cyst with 1 nucleus, rarely 2 or 4 nuclei
Other features				
Trophozoites				
Chromatin (stained)	Chromatin peripheral, may have beaded appearance	Nucleus may stain more darkly than <i>E. histolytica</i> , chromatin may appear as solid ring rather than beaded (trichrome)	Chromatin clumped and unevenly arranged, appears as solid ring with no beads	Chromatin finely granular, chromatin may also be clumped at one or both edges of membrane
Karyosome (stained)	Karyosome small, compact, centrally located but may be eccentric	Karyosome usually small and compact; centrally located or eccentric	Karyosome large, not compact, may or may not be eccentric, may be diffuse or darkly stained	Karyosome small and usually centrally located
Cytoplasm (stained)	Cytoplasm is fine, granular, may contain bacteria; presence of RBCs diagnostic for <i>E. histolytica</i> , although some <i>E. dispar</i> strains may very occasionally contain RBCs	Cytoplasm finely granular, may contain bacteria, no RBCs	Cytoplasm granular with differentiation into cytoplasm and endoplasm, vacuolated; bacteria, yeast, and other debris may be present	Cytoplasm is finely granular, may contain ingested bacteria
Cysts				
Chromatin (stained)	Chromatin peripheral with fine uniform granules, evenly distributed	Chromatin granules evenly distributed (nuclear characteristics may be difficult to see)	Chromatin coarsely granular, may be clumped and unevenly arranged	Chromatin finely granular
Karyosome (stained)	Karyosome is small, compact, usually centrally located but occasionally eccentric	Karyosome is small, compact, usually centrally located	Karyosome large, eccentric, occasionally centrally located	Karyosome small and usually centrally located
Cytoplasm (stained)	May be present; chromatoidal bodies usually elongate with blunt, rounded, smooth edges; may be round or oval; chromatin may be diffuse or absent in mature cyst; clumped chromatin mass may be present in early cysts	Usually present; chromatoidal bodies usually elongate with blunt, rounded, smooth edges; may be round or oval; chromatin may or may not be present	May be present (less frequent than in <i>E. histolytica</i>), splinter shaped with rough pointed ends, may be diffuse or absent in mature cysts, clumped mass occasionally seen in mature cysts	Abundant chromatoidal bodies with angular pointed ends, thread-like chromatoidal bodies may also be present, half of the cysts contain spherical or ovoidal inclusion mass

Remarque : *E. bangladeshi* n'est pas décrit dans ce tableau car la publication date d'avant la découverte de cette espèce.

La contamination se fait par l'ingestion de kystes matures présents dans les aliments ou l'eau (Figure 2) [19]. Le dékystement se produit au niveau de l'intestin grêle où se forment des trophozoïtes qui migreront dans le colon. Certains vont ensuite se ré-enkyster. Les deux formes vont être libérées dans les selles. Les kystes permettent la dissémination de la maladie car ils peuvent persister plusieurs semaines dans les sols et l'eau à la différence des trophozoïtes, qui sont fragiles et sont rapidement détruits. Dans de nombreux cas chez des personnes asymptomatiques, les trophozoïtes restent confinés dans la lumière intestinale et le patient n'élimine que les kystes. Pour certaines espèces, en particulier *E. histolytica*, un envahissement de la muqueuse colique par les FV peut-être observé, avec une possible dissémination du parasite à d'autres organes.

Un autre mode de contamination moins fréquent passe par une exposition à des matières fécales lors d'un contact sexuel oro-anal [20]. Dans ce cas les kystes mais aussi les FV pourraient se révéler infectieux [19].

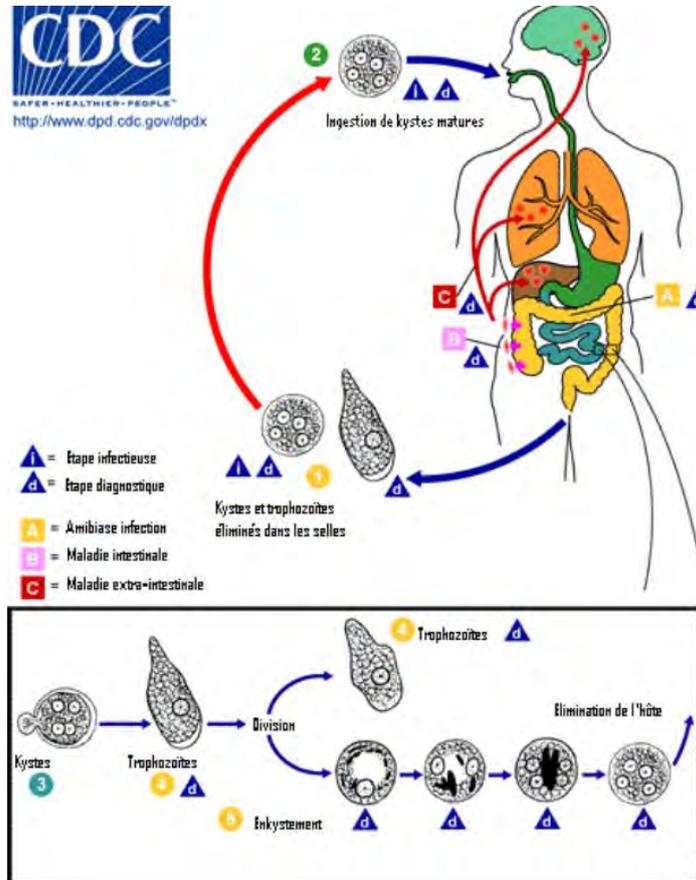


Figure 2 : Schéma du cycle d'*E. histolytica*

I-3 Taxonomie, phylogénie et spécificité d'hôtes

D'un point de vue taxonomique [21], ces organismes font partie :

- Du règne des eucaryotes (ce sont des organismes unicellulaires)
- De l'embranchement des amibozoaires (ils se déplacent grâce à des prolongements cytoplasmiques ou pseudopodes)
- De la classe des archéamibes (ils ne présentent pas de mitochondries)

Les relations phylogénétiques sont disponibles pour plusieurs espèces d'*Entamoeba*. En 2016, C. Rune Stensvold *et al.* ont travaillé sur les relations de parenté entre les différentes espèces d'*Entamoeba* et ont proposé une classification [22]. Cette classification a été reprise par Alison S. Jacob *et al.* en intégrant *E. bangladeshi* (Figure 3) [23]. *E. polecki* est divisé en 4 sous-types (ST1, ST2, ST3, ST4). A la différence d'*E. hartmanni* qui présente une faible variation génétique, *E. coli* possède la plus forte diversité intra génétique (plus de 15% de sites polymorphes sur le gène SSU ARNr). Pour *E. coli*, on retrouve deux clades différents nommés sous-types ST1 et ST2. ST1 est représenté par les numéros d'accès de GenBank (AF149915) et (FR686334) et ST2 par les numéros (AF149914) et (AB444953) (Figure 4) [22].

L'analyse phylogénétique permet de montrer que la longueur des branches entre les espèces du complexe *Eh* / *Ed* / *Em* / *Eb* est courte. Les séquences correspondantes sont donc proches en termes d'évolution par rapport à leurs ancêtres communs et entre-elles, ce qui peut expliquer qu'elles soient morphologiquement indifférenciables. L'arbre montre aussi qu'*E. ecuadoriensis* et *E. nuttalli* sont proches de ce complexe. Cependant ces espèces n'ont jamais été décrites chez l'Homme.

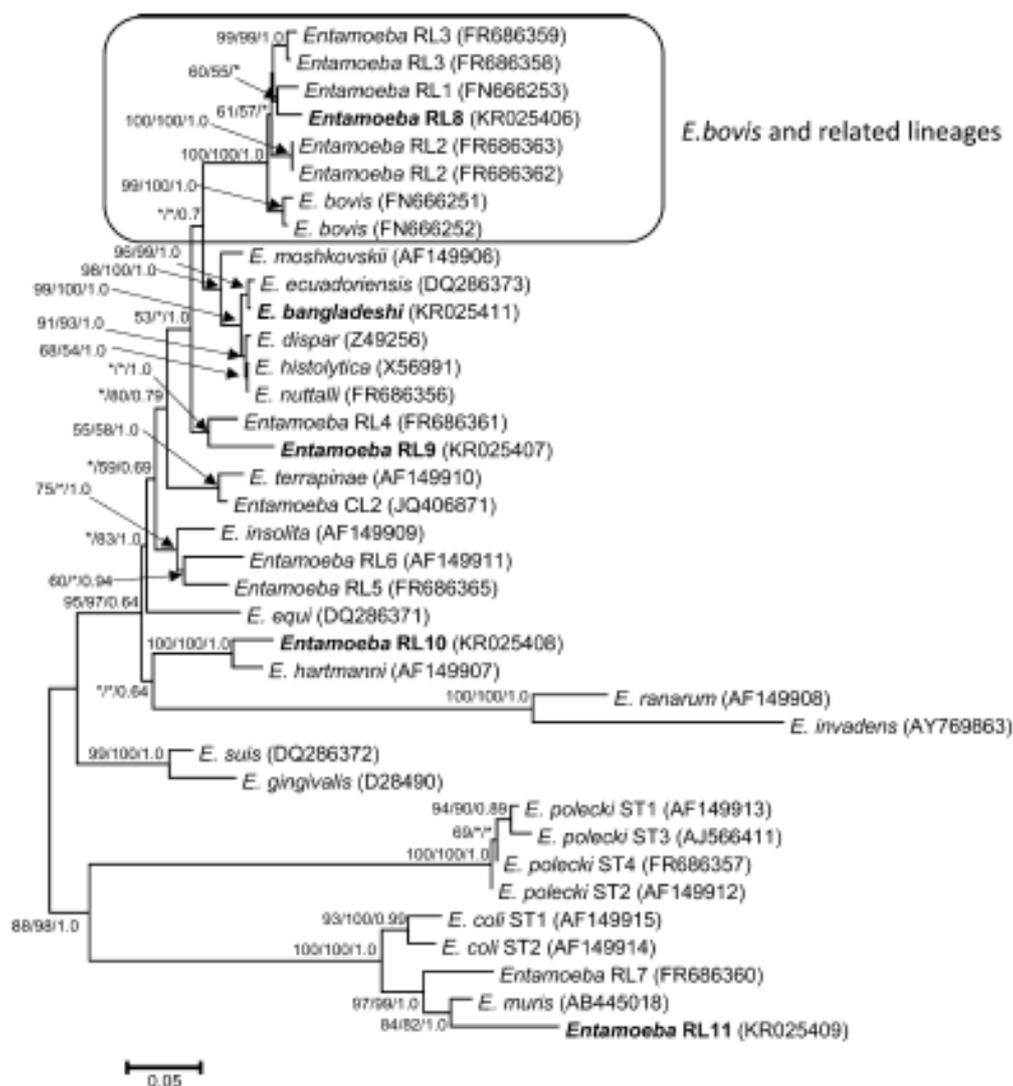


Figure 3 : Arbre phylogénétique d'*Entamoeba* sp. réalisé à partir de la sous-unité 18S [23]

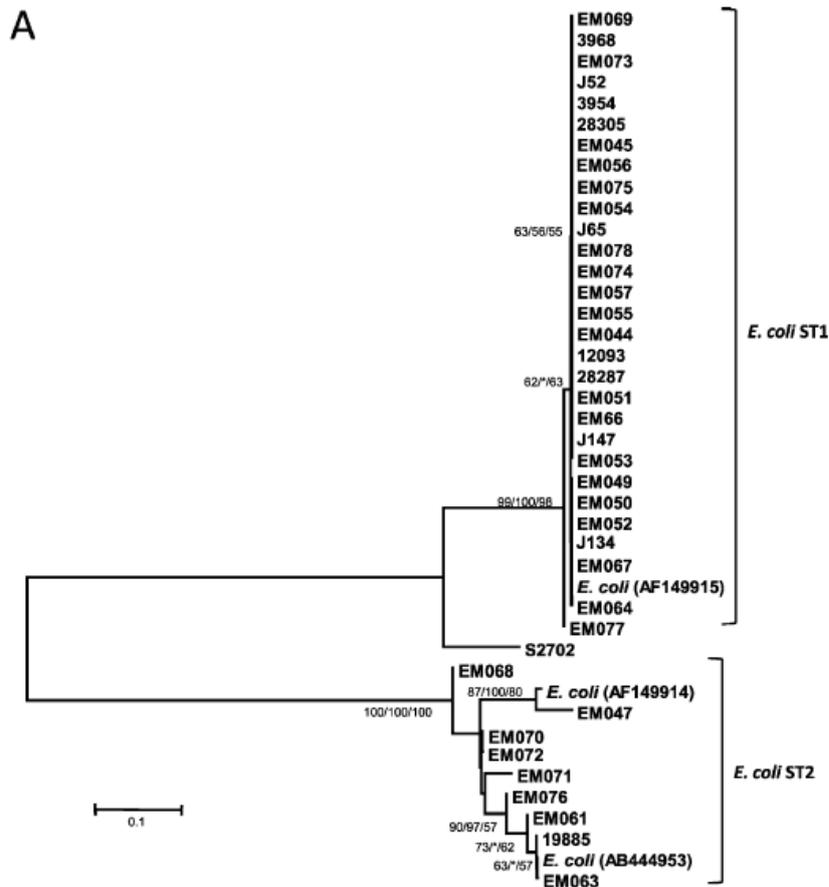


Figure 4 : Arbre phylogénétique des séquences partielles de la sous-unité 18S représentant les variations intraspécifique pour *E. coli* [22]

Le genre *Entamoeba* comprend de nombreuses espèces dont les spécificités d'hôtes varient. Elles peuvent être retrouvées chez l'être humain, chez d'autres vertébrés ainsi que chez des invertébrés [22]. La découverte de nouveaux hôtes est fréquente depuis le développement des outils moléculaires. Six espèces chez l'Homme ont aussi été décrites chez d'autres êtres vivants. Par exemple, *E. polecki* a été retrouvée chez d'autres mammifères et des oiseaux [22]. *E. hartmanni* a été décrite chez des primates et des zèbres ; *E. moshkovskii* chez des ruminants, des éléphants et des tortues aquatiques ; *E. coli* chez d'autres primates ; *E. histolytica* et *E. dispar* chez des rats [23]. La spécificité d'hôtes d'*E. bangladeshi* est incertaine du fait de sa récente découverte.

II- Pathogénicité des différentes espèces d'*Entamoeba*

II-1 Pathogénicité d'*E. histolytica*

L'amibiase a été définie par l'OMS, en 1997, comme étant une infection provoquée par *E. histolytica* [10]. Dans environ 90% des cas, l'infection est asymptomatique [24]. Cependant, dans 4 à 10% des cas, ces formes peuvent évoluer en formes symptomatiques dans la première

année de l'infection [25] [26] [27]. Les formes symptomatiques de la maladie peuvent se manifester par une amibiase intestinale ou extra-intestinale.

L'amibiase intestinale peut se présenter sous différentes formes par envahissement de la muqueuse intestinale. Elle peut entraîner des diarrhées aiguës banales, des douleurs abdominales dans les formes les plus courantes, jusqu'à la dysenterie amibienne caractérisée par des selles afécales, glairo-sanglantes associée à des épreintes et des ténésmes. Elle est le plus souvent apyrétique (dans plus de 60% des cas) [25]. Des dysenteries graves peuvent évoluer en colites fulminantes, en amœbomes, en mégacôlon toxique ou en perforation du colon [24]. Ces formes sont rares mais graves. Le taux de mortalité associé à ces complications est élevé. La mortalité par colite amibienne fulminante est supérieure à 40% [25]. Une forme chronique de l'amibiase intestinale est décrite dans la littérature. Elle associe des alternances de diarrhées et de constipations avec des spasmes abdominaux. Cependant cette forme est controversée [24].

Les formes extra-digestives se manifestent, dans la plus grande majorité des cas par une amœbose hépatique. Les abcès hépatiques sont dus à une propagation hématogène de trophozoïtes ayant pénétrés la muqueuse colique. La forme classique est représentée par la triade de Fontan (douleur aiguë et violente de l'hypocondre droit, fièvre et hépatomégalie). La plupart des individus ayant un abcès hépatique ne présentent aucun symptôme intestinal concomitant. Cette maladie peut se manifester plusieurs mois ou années après l'exposition à *E. histolytica*. Depuis l'introduction d'un traitement médical, la mortalité des amœboses hépatiques a chuté à 1-3% [25]. D'autres formes extra-intestinales peuvent se développer dans différents organes au niveau pleuro-pulmonaire, cérébral, péricardique, etc. Ces formes restent exceptionnelles [28].

II-2 Pathogénicité d'*E. moshkovskii* et d'*E. bangladeshi*

De plus en plus d'articles étudiant *E. moshkovskii* fournissent des arguments en faveur d'une pathogénicité de cette espèce. Les résultats d'une étude menée par Chikako Shimokawa *et al.* ont montré qu'*E. moshkovskii* pouvait être un pathogène pour la souris, provoquant des diarrhées, une perte de poids et des colites [16]. L'examen histopathologique des *caeca* de ces souris a révélé des ulcérations épithéliales et des destructions tissulaires. Dans la même étude, ils ont constaté que chez des nourrissons au Bangladesh, une infection à *E. moshkovskii* était associée à des diarrhées. En Australie, sur 55 échantillons de selles positifs à *Entamoeba* chez des patients symptomatiques, 3 patients pour lesquels *E. moshkovskii* était le seul agent pathogène détecté présentaient des diarrhées et des douleurs abdominales [29]. En Inde, un

patient souffrant de dysenterie était infecté par *E. moskovskii* avec aucune autre cause mise en évidence [30]. Au Pakistan, les infections à cette espèce étaient associées à des diarrhées [31].

La pathogénicité d'*E. bangladeshi* n'est pas encore définie, du fait de sa récente découverte. Cette amibe a été isolée au Bangladesh chez des enfants aussi bien asymptomatiques que chez des enfants présentant des diarrhées [32]. Le même constat a été fait chez des patients Sud-Africains positifs à *E. bangladeshi*. Chez les patients infectés par cette espèce, il n'y avait pas de différence significative entre ceux présentant des diarrhées et les patients asymptomatiques [33]. D'autres études sont nécessaires pour mieux connaître la niche écologique de ce parasite et son éventuelle pathogénicité.

II-3 Pathogénicité des autres espèces

Actuellement, il existe un large consensus en faveur d'une non-pathogénicité d'*E. dispar*, d'*E. coli*, d'*E. hartmanni* et d'*E. polecki* [18]. Cependant quelques études remettent en cause ce paradigme, et proposent que d'autres recherches soient réalisées pour approfondir le sujet.

Par exemple une étude a montré que, chez des adolescents en Indonésie, la présence d'*E. hartmanni* était associée à des diarrhées légères [34]. De même un cas de colite amibienne à *E. dispar* a été décrit chez une femme présentant des troubles digestifs et des diarrhées chroniques et pour lesquels aucun autre pathogène n'avait été identifié. Un traitement anti-amibien a permis d'améliorer les symptômes [35]. Une étude a décrit le développement d'abcès hépatiques amibiens chez des hamsters inoculés avec des souches xéniques (culture en présence d'une flore principalement bactérienne) d'*E. dispar* qui étaient isolées de patients brésiliens asymptomatiques [36]. Les cultures axéniques (culture sans autre espèce) et monoxéniques (culture avec une autre espèce) n'ont pas permis de produire des abcès amibiens. Les auteurs ont donc suggéré que l'association avec des bactéries pouvaient être important pour qu'*Entamoeba* acquiert une pathogénicité [37]. Fabrício Marcus Silva Oliveira *et al.* se sont intéressés à la relation entre *E. dispar* et les bactéries pathogènes et principalement avec *Salmonella typhimurium*. Ils ont testé cette co-infection chez des rats. La présence uniquement d'*E. dispar* avait conduit à des zones de destruction des muqueuses et d'inflammation des sous-muqueuses. Les lésions étaient beaucoup plus franches avec des zones de nécroses intestinales chez les rats co-infectés. L'infection à *Salmonella sp.* seule n'avait pas conduit à des destructions des muqueuses. Ils ont conclu que les futures études de biologie moléculaire pourraient permettre de savoir si les bactéries favorisent l'expression des facteurs de virulence amibienne et/ou si les lésions épithéliales seules causées par des bactéries favorisent l'adhésion

et l'invasion des trophozoïtes [36]. D'autres scientifiques s'intéressent, quant à eux, à la nature des relations entre hôte et microbiote et leur incidence en matière de santé, en particulier dans les maladies auto-immunes et inflammatoires. Il a été montré qu'une augmentation de la bactérie commensale *Prevotella copri* était associée à des diarrhées provoquées par *E. histolytica* [33]. Ils en ont conclu que même si cette étude n'a pu mettre en évidence le même phénomène pour *E. bangladeshi* et *E. dispar*, il serait intéressant de savoir si les autres espèces d'*Entamoeba* pourraient avoir un impact important sur la composition de la microflore.

III-Description des différentes techniques pour le diagnostic des *Entamoeba*

Les techniques disponibles pour l'identification des espèces d'*Entamoeba* sont :

- la microscopie optique (MO)
- la culture et l'analyse des isoenzymes
- la détection d'antigènes
- la sérologie
- la biologie moléculaire
- autres techniques

III-1 La microscopie optique

La MO peut être réalisée à partir d'un examen direct de selles (+/- coloration) ou après concentration (technique du MIF concentration, technique de Bailenger, etc). La MO permet la mise en évidence de kystes et de FV. Les FV sont très fragiles et ne peuvent être identifiées que dans des échantillons frais (moins de 4H) ou immédiatement fixés après recueil de selles, de biopsies coliques, ou de ponction-drainage d'abcès [38]. Les formes kystiques sont plus résistantes et sont uniquement visibles dans les selles. Les caractéristiques des différentes espèces sont décrites dans le Tableau 1. Les espèces du complexe *Eh / Ed / Em / Eb* sont non différenciables en MO [8]. Dans la plupart des cas, les autres espèces se différencient facilement en MO [38]. Les kystes matures d'*E. Coli* se caractérisent par 8 noyaux, par leur grande taille (>15µm) et leur paroi épaisse. *E. polecki* est plus petit que le complexe *Eh / Ed / Em / Eb* et ne présente qu'un noyau unique. Enfin *E. hartmanni* se distingue par sa petite taille (<10µm).

Cette technique est actuellement la plus utilisée car elle est rapide, peu coûteuse et facile à mettre en place dans les pays en voie de développement. Cependant, elle nécessite une expertise importante des personnels de laboratoire et manque de sensibilité et de spécificité.

Le manque de sensibilité peut notamment être expliqué par la fragilité des FV et par une excrétion variable des kystes dans les selles. L'examen d'un seul échantillon de selles

montre une sensibilité comprise entre 58 et 72% pour la recherche de protozoaires. L'analyse de trois échantillons sur 10 jours permet un gain diagnostique de plus de 20% [38].

La spécificité est faible car elle ne permet pas de distinguer morphologiquement le complexe *Eh / Ed / Em / Eb*. De plus, la différenciation microscopique des espèces de ce complexe des autres espèces non pathogènes, nécessite du personnel de laboratoire expérimenté et aguerri à la reconnaissance morphologique des amibes [8]. Selon la maturité des kystes, les espèces peuvent être confondues. *E. polecki* peut être confondue microscopiquement avec des kystes immatures d'une espèce du complexe *Eh / Ed / Em / Eb* qui ne présente qu'un seul noyau [39]. Comme vu précédemment, le kyste mature d'*E. coli* possède 8 noyaux. Parfois des variations génétiques au sein de cette espèce peuvent entraîner des kystes plus petits et immatures qui peuvent aussi être confondus avec une espèce du complexe *Eh / Ed / Em / Eb* [40]. Ainsi, lorsque des kystes d'*Entamoeba* sont trouvés en MO, il est souvent nécessaire de recourir à une technique spécifique d'identification d'*E. histolytica* avec une technique de détection d'antigènes ou une technique de biologie moléculaire [38].

III-2 Culture et analyse des isoenzymes

La culture d'amibes dans différents milieux (xénique, monoxénique ou axénique) et l'analyse des isoenzymes ne sont pas utilisées en routine du fait de leurs nombreux inconvénients. La croissance des amibes en culture est difficile et fastidieuse, demandant beaucoup de temps pour un résultat souvent infructueux [8]. Elles sont en revanche encore utilisées pour la recherche.

III-3 Détection d'antigènes

Cette technique permet de détecter des antigènes parasitaires directement dans les échantillons de selles. Elle est un bon outil diagnostique dans les pays endémiques et pauvres en ressources car elle est simple à réaliser, rapide, ne nécessite ni expertise, ni instrumentation complexe. Elle est plus sensible que la microscopie et permet un diagnostic d'infection aigüe [8]. Plusieurs tests commerciaux, ELISA ou immunochromatographiques unitaires (TDR) sont disponibles. Certains tests sont spécifiques d'*E. histolytica* et d'autres détectent *E. histolytica* et *E. dispar* [8]. Cependant la sensibilité et la spécificité diagnostiques varient d'une étude à l'autre [41].

III-4 Sérologie

Différents tests sérologiques spécifiques à *E. histolytica* ont été développés. Dans les pays endémiques, ces tests sont peu utiles car ils ne distinguent pas une immunité ancienne d'une infection aiguë. Ceci s'explique par un fort pourcentage de personnes ayant déjà été en contact avec *E. histolytica* et de la persistance pendant des années des anticorps spécifiques après une infection guérie, traitée ou non. Ces tests sont plus intéressants dans les pays non endémiques [8]. Ils sont principalement utilisés pour la recherche d'abcès amibiens. Cependant, il a été montré que pour les sujets résidant hors zone d'endémie amibienne, la détection des anticorps permettait aussi de diagnostiquer les atteintes amibiennes intestinales aiguës ou même le simple portage asymptomatique d'*E. histolytica* [38]. Dans diverses études concernant les formes extra-intestinales, les tests disponibles ont montré plus de 90% de sensibilité et de spécificité [38]. Les tests d'hémagglutination indirecte ou d'agglutination de particules de latex sont progressivement remplacés par les kits ELISA [38]. Il n'existe pas de test sérologique détectant *E. moshkovskii* ou *E. bangladeshi* [8].

III-5 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Depuis la distinction des espèces *E. dispar* et *E. histolytica*, de nombreuses PCR ont été développées afin d'identifier précisément les espèces d'*Entamoeba*. La PCR est une technique de choix pour le diagnostic d'espèces.

III-5-1 Extraction des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques constitue l'étape initiale des examens de biologie moléculaire. L'échantillon de selles est un prélèvement complexe du fait des inhibiteurs d'amplification qui peuvent être présents et qui peuvent entraîner des faux négatifs [42], mais également de la fragilité des trophozoïtes et de la grande résistance des kystes [38]. Il existe plusieurs kits commerciaux comme par exemple le QIAamp Stool DNA Mini KIT (QIAGEN) qui est souvent utilisé dans les études. Cependant, plusieurs groupes ont signalé une optimisation de la procédure d'extraction d'ADN avec différentes techniques. Certains recommandent un prélavage des selles avec une solution saline tamponnée au phosphate, remises en suspension dans de la polyvinylpyrrolidone chauffées puis traitées à la protéinase K [43]. Une étape d'incubation pendant une nuit avec de la protéinase K et du dodécyl sulfate de sodium permettrait d'améliorer l'extraction des acides nucléiques (AN) [44] ou encore une congélation des échantillons de selles avant l'extraction des AN [45].

III-5-2 PCR

La PCR repose sur l'amplification spécifique d'une séquence nucléotidique. En 2015, Ali *et al.* ont publié une revue de la littérature des différentes PCR, des différents gènes et des différentes amorces utilisés pour le diagnostic moléculaire d'*E. histolytica*, *E. dispar* et *E. moshkovskii* [8]. Dans cet article aucune PCR n'avait encore été développée pour *E. bangladeshi*, ce qui a été fait depuis cette date [33]. Les performances annoncées de ces PCR sont toutes excellentes (>90% de sensibilité et 100% de spécificité) même s'il est difficile de comparer les techniques entre elles [38]. La PCR classique a été supplantée par la PCR en temps réel. Cette dernière présente des avantages, comme une plus grande spécificité en raison de la présence de sondes, une réduction du risque de contamination et une meilleure sensibilité. Les sondes TaqMan, les balises moléculaires ou le Sybergreen sont notamment utilisées pour la PCR en temps réel [18].

Concernant les gènes candidats, la région de l'ARN ribosomique 18S est la cible la plus souvent utilisée. Il s'agit d'un constituant de la petite sous-unité 40S des ribosomes d'eucaryotes [46]. Les gènes codant pour cette petite sous-unité sont présents dans une région très conservée chez les eucaryotes et à partir de laquelle de nombreuses PCR sont développées. D'autres gènes cibles ont été utilisés comme le gène codant pour l'hémolysine HLY6 (gène utilisé pour le diagnostic spécifique d'*E. histolytica*) [41]. Parmi les nombreuses amorces développées et décrites, il existe des amorces spécifiques d'une espèce et des amorces communes à différentes espèces [47].

Cependant le coût, les ressources matérielles et la nécessité d'un personnel qualifié sont de réels obstacles pour l'utilisation de la PCR en routine en tant qu'outils diagnostiques dans la plupart des zones d'endémie. Pour les laboratoires ayant les ressources nécessaires, cette technique est principalement utilisée pour l'identification d'*E. histolytica*. Par contre, elle présente un intérêt majeur pour la recherche [41].

Ces dernières années, des approches en PCR multiplex se sont développées permettant ainsi une identification simultanée de plusieurs agents pathogènes. Certaines de ces PCR multiplex ont été commercialisées comme le kit Amplidiag® Stool Parasite (Roche) qui détecte simultanément 4 parasites, *E. histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis* et *Giardia intestinalis*. Il existe aussi Le kit RIDA®GENE Parasitic Stool Panel (R-Biopharm), le BD MAX™ Enteric Parasite Panel, le FTD Stool parasites, le G-DiaPara™ (Diagenode

Diagnostics), le Roche LightMix® Gastro parasites multiplex. Les performances diagnostiques des différents kits varient en fonction de la méthode utilisée et de l'espèce pathogène cible [48].

III-5-3 Autres techniques

Le test LUMINEX® à base d'ADN est une technique où les oligonucléotides sont conjugués à la surface des billes pour capturer l'ADN du pathogène amplifié lors de la PCR. L'intérêt principal de cette technique est qu'elle permet de détecter de nombreuses séquences d'ADN simultanément et avec de petits volumes d'échantillons. Santos *et al.* ont mis au point un test Luminex pour la détection simultanée de 5 espèces d'*Entamoeba* (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. coli* et *E. hartmanni*) [49]. D'autres auteurs ont développé une technique Luminex® capable de détecter simultanément 19 agents pathogènes gastro-intestinaux différents (virus, bactéries, parasites dont *E. histolytica*). L'évaluation des performances de ce test retrouve une sensibilité à 100% et une spécificité à 89% pour la détection d'*E. histolytica* [50].

L'amplification isotherme à médiation par boucle (LAMP) est une technique d'amplification de l'ADN utilisant une température constante. La détection du produit d'amplification peut être réalisée par photométrie. Shih-Yu Liang *et al.* ont mis au point une technique LAMP pour l'identification d'*E. histolytica*, la sensibilité et la spécificité sont similaires à la PCR conventionnelle utilisée dans l'étude [51]. De plus, cette technique présente l'avantage, en plus d'une bonne sensibilité et spécificité, d'être rapide et facile d'utilisation [41]. Cependant, elle ne permet pas de faire de multiplexage.

Les POCT (point of care tests) sont des tests unitaires de diagnostic de laboratoire destinés à être effectués à proximité du patient. Des POCT ont été développés pour la détection spécifique d'*E. histolytica* [52]. Leur facilité d'utilisation et leur faible coût peuvent permettre leur utilisation pour un dépistage de masse des populations vivant dans des zones d'endémies. En fournissant un résultat rapide, la prise en charge associée peut être plus efficace. La sensibilité et spécificité de ces tests sont variables selon les études [41].

IV-Application des techniques en clinique ou à visée épidémiologique

IV-1 Application en clinique : Stratégie diagnostique

Les techniques disponibles présentent un certain nombre d'avantages et d'inconvénients qui ont été évoqués dans la partie précédente. Le choix des techniques ne sera donc pas le même selon les politiques locales et les ressources disponibles (ressources financières, en main d'œuvre qualifiée, en installations) dans les différents laboratoires ou pays du monde.

Comme le recommande l'OMS, l'objectif est d'identifier spécifiquement *E. histolytica*, agent responsable de l'amibiase et, le cas échéant, de traiter l'infection [10]. Lors de l'identification d'une espèce d'*Entamoeba*, la différenciation entre *E. histolytica* et les autres espèces est donc une étape cruciale pour une prise en charge adaptée des patients. La stratégie diagnostique est variable selon que l'on suspecte une amibiase intestinale ou extra-intestinale.

Pour la recherche d'une amibiase intestinale, les techniques les plus intéressantes en termes de spécificité et de sensibilité sont la recherche d'antigène dans les selles ou la biologie moléculaire. Ces techniques peuvent se substituer à la microscopie optique [38]. Si le patient n'est pas originaire d'une zone d'endémie, la sérologie peut aussi apporter des informations utiles.

Pour la recherche d'une amibiase tissulaire, la sérologie présente un intérêt si le patient n'est pas originaire de zone d'endémie. La biologie moléculaire ou la détection d'antigène peuvent aussi être utilisées sur des échantillons tels que les biopsies, abcès, sang, urines, etc.

Les autres espèces d'*Entamoeba* sont le plus souvent identifiées de manière fortuite au cours d'un EPS. A l'heure actuelle aucune stratégie diagnostique spécifique n'existe pour *E. moshkovskii*, espèce considérée comme potentiellement pathogène.

IV-2 Application à l'épidémiologie

La compréhension de l'épidémiologie des maladies infectieuses a progressé avec les progrès technologiques réalisés en biologie moléculaire [53]. L'épidémiologie des différentes espèces d'*Entamoeba* a évolué régulièrement au cours du temps en parallèle du développement de nouvelles techniques plus sensibles et spécifiques et de la découverte de nouvelles espèces. A l'heure actuelle, l'épidémiologie basée sur les techniques dites classiques (microscopie, sérologie, détection antigénique) a tendance à être supplantée par l'épidémiologie moléculaire du fait du développement des différents outils moléculaires.

L'épidémiologie moléculaire peut être définie comme l'étude des rapports entre les maladies et les facteurs susceptibles d'exercer une influence sur leur fréquence, leur distribution, leur évolution dans les populations humaines et non humaine en utilisant la biologie moléculaire.

Dans une méta-analyse de 2014, Ali *et al.* ont recueilli la prévalence d'*E. histolytica* selon différentes méthodes [8]. La MO, technique de référence était la technique la plus utilisée (26 références d'articles pour la MO contre 4 pour la sérologie, 6 pour la détection d'antigènes et 5 pour la biologie moléculaire). De nombreuses études épidémiologiques utilisent encore la MO, malgré son manque de sensibilité et de spécificité. Et c'est principalement le cas pour les espèces, *E. hartmanni*, *E. polecki* et *E. coli*, espèces morphologiquement différenciables d'*E. histolytica*.

La détection d'antigènes et la sérologie présentent un intérêt principalement pour *E. histolytica*.

La PCR a conduit à une réévaluation de l'épidémiologie, notamment dans les zones endémiques et principalement pour différencier le complexe *Eh / Ed / Em / Eb* [18]. Depuis le début des années 1990, différents types de PCR ont été développés comme les PCR classiques (simplex, duplex, multiplex ou nichée) et les PCR temps réel (simplex ou multiplex). Les premières PCR conventionnelles permettant de différencier *E. histolytica* et *E. dispar* datent de 1992. Cette année-là, Acuna-Soto *et al.* ont développés pour la première fois une PCR utilisée pour une étude épidémiologique [3]. Le premier développement de PCR en temps réel pour la détection d'*E. histolytica* a été réalisé par Blessmann *et al.* en 2002 [54]. En 2003, Ali *et al.* ont été les premiers à développer une PCR permettant d'identifier *E. moshkovskii* en plus des deux précédentes espèces [8]. Enfin c'est grâce à la biologie moléculaire qu'a été identifiée *E. bangladeshi* en 2011 [17].

Les outils moléculaires et en particulier le séquençage ont permis d'analyser la phylogénie et la taxonomie des différentes espèces d'*Entamoeba*. Les relations phylogénétiques ont été étudiées pour plusieurs espèces d'*Entamoeba* [22]. L'ARN ribosomique 18S est très utilisé pour établir et analyser les relations phylogénétiques entre les organismes eucaryotes, en particulier pour détecter, différencier et sous-typé les amibes intestinales compte tenu de la diversité intragénétique chez certaines espèces [40].

V- Distributions et prévalences des différentes espèces du genre *Entamoeba*

V-1 Facteurs associés à la contamination humaine

Le mode de contamination par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par des kystes explique la distribution différente des *Entamoeba* dans le monde. La prévalence est plus élevée dans les pays en développement où les conditions d'hygiène et d'assainissements sont précaires [53]. Les régions endémiques décrites pour l'amibiase sont principalement en Afrique, en Asie du Sud et Sud-Est, en Amérique centrale et du Sud [8] [24].

Différentes enquêtes épidémiologiques décrivent d'autres facteurs de risque dans les pays endémiques. L'âge est un facteur souvent identifié. Au Bangladesh où les maladies diarrhéiques sont la principale cause de mortalité infantile, 33% (76/232) des enfants âgés de 2 à 5 ans présentaient des signes sérologiques d'exposition à *E. histolytica* [55]. Au Yémen, la prévalence des infections par *E. moshkovskii* et *E. dispar* augmentait significativement jusqu'au groupe des 21 à 30 ans, puis diminuait chez les participants plus âgés [56]. Le surpeuplement, la présence d'autres membres de la famille infectés, les habitudes culturelles, le niveau d'instruction et le statut-socio-économique sont aussi des facteurs de risque identifiés dans certaines études [53] [56].

Dans les pays développés, l'infection est limitée à certains groupes de personnes tels que les voyageurs allant dans les zones d'endémie et les immigrants originaires de régions endémiques. Il est aussi cité les homosexuels masculins, les patients VIH, et les personnes institutionnalisées [8] [57] [58]. Chez les homosexuels masculins, il existe un fort taux de parasitisme intestinal qui pourrait être lié aux pratiques sexuelles *via* les rapports oro-anaux [59]. Par exemple, Rodney James *et al.* ont réalisé une étude, en Australie, chez des homosexuels masculins, chez des non-homosexuels masculins, des patients VIH positifs et négatifs. Dans la population des homosexuels, quel que soit le statut VIH, ils ont mis en évidence des taux significativement plus élevés d'infections par des protozoaires entériques tels qu'*Entamoeba sp.* par rapport au reste de la population [60].

Concernant l'association entre l'infection à *Entamoeba sp* et le statut VIH, les conclusions divergent selon les études. Au Japon, il a été constaté une augmentation de la séroprévalence à *E. histolytica* depuis les dix dernières années mais sans constater une différence significative selon le statut VIH [61]. Mais au Mexique, une augmentation significative d'infection à *E. dispar* a été constatée dans la population VIH [62].

V-2 Prévalence du complexe *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* et *E. bangladeshi*

Les données de prévalence, de mortalité et de morbidité mondiale commencent à dater pour *E. histolytica*. Les chiffres souvent cités datent d'un rapport de l'OMS de 1985 [63]. 480 millions de personnes seraient infectées et 48 millions souffriraient d'amibiase invasive responsable de 40 000 à 100 000 décès par an. Ces chiffres étaient très probablement erronés du fait de la non prise en compte dans ces résultats de la distinction entre *E. dispar*, *E. moshkovskii* et *E. bangladeshi*. L'OMS en 1997 mentionne qu'il n'existe pas de données exactes de prévalence d'*E. histolytica* [10]. Depuis, il n'y a pas eu de réévaluation de la prévalence et de la morbi-mortalité mondiale. Les études récentes s'attachent à déterminer la prévalence dans des populations particulières (enfants asymptomatiques, personnes hospitalisés présentant des diarrhées, homosexuels masculins, etc)[24]. Depuis la différenciation entre *E. histolytica* et *E. dispar*, il est estimé que cette dernière serait 10 fois plus abondante qu'*E. histolytica* mais avec des prévalences locales pouvant varier considérablement [8]. En Inde, *E. dispar* était 8 fois plus abondant qu'*E. histolytica* (8,8% versus 1,7%) [30]. Dans certaines études, les taux de prévalence entre ces deux espèces sont similaires, voire *E. histolytica* est plus fréquent. Au Mexique, dans une population asymptomatique, la prévalence d'*E. histolytica* était de 13,8% contre 9,6% pour *E. dispar* [64].

E. moshkovskii a été signalée dans de nombreux pays comme au Bangladesh [65], en Inde [30], en Australie [29], au Yémen [56], en Colombie [66], en Malaisie [67], Iran [68], Tanzanie [69], en Tunisie [70], Thaïlande [71]. En Italie, *E. moshkovskii* a été identifiée dans les boues d'épuration de Pavie mais aucune description chez l'Homme n'a encore été faite [72]. Des taux de prévalence, parfois, aussi élevés qu'*E. histolytica* et *E. dispar* ont été rapportés. A partir de la biologie moléculaire, les données de prévalence les plus anciennes pour *E. moshkovskii* datent de 2003, où la population étudiée était des enfants de 2 à 5 ans vivants au Bangladesh. Cette espèce a été retrouvée de façon très répandue avec une prévalence de 21,1% [65]. En Australie, l'infection à *E. moshkovskii* était même plus fréquente que l'infection à *E. histolytica* ou *E. dispar* avec une prévalence de 0,99% [29].

La manière dont *E. bangladeshi* contribue à la prévalence mondiale reste inconnue du fait de sa récente découverte. Elle a été décrite au Bangladesh en 2011 puis en Afrique du Sud, en 2017, où la prévalence était de 4,5% (22/484) [17] [33].

V-3 Prévalence de *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki*

Les données épidémiologiques concernant ces 3 espèces sont plus rares que le complexe *Eh / Ed / Em / Eb*, car elles sont considérées comme non pathogènes. Les principales études sont faites en MO. Quelques résultats sont obtenus par biologie moléculaire et montrent des taux de prévalence souvent élevés pour *E. hartmanni* et *E. coli*. En Indonésie, chez des enfants de 7 à 15 ans en bonne santé, la prévalence obtenue par biologie moléculaire était de 44,4 % pour *E. coli* et 31,3% pour *E. hartmanni*, alors qu'elle était de 6,9% pour *E. dispar* [34]. La même observation a été faite au Kenya chez des enfants VIH positifs et VIH négatifs avec des taux de prévalence de 26,8% pour *E. coli*, 14,6% pour *E. hartmanni* et 3,3% pour *E. dispar* chez les enfants VIH positifs. Des taux parfois plus élevés, ont été observés chez les VIH négatifs (51,4% ; 27,9% et 5,4% respectivement) [73].

Comme vu précédemment, les souches d'*E. coli* sont divisées en 2 sous-types (ST1 et ST2). Actuellement, le sous-type ST1 a été retrouvé uniquement chez l'Homme et ST2 a été décrit chez les Hommes et chez d'autres espèces non humaines. ST1 est plus répandu que ST2 [74].

Les publications concernant *E. polecki* (ST1, ST2, ST3, ST4), sont beaucoup plus rares. En Suède, Christen Rune Stensvold *et al.* ont, à partir de la biologie moléculaire et de la revue de la littérature, fait le point sur l'épidémiologie d'*E. polecki*. Cette étude montre, qu'à l'heure actuelle, la prévalence de cette espèce est faible. Cependant elle semble avoir une distribution géographique étendue avec des identifications en Asie, en Amérique du Nord, en Europe et en Afrique [75]. Le sous-type ST4 est le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme [22].

VI- Traitement

En 1997, l'OMS recommandait d'identifier spécifiquement *E. histolytica* et le cas échéant de traiter l'infection. Par contre, si *E. dispar* est identifiée aucun traitement n'est nécessaire pour cette espèce [10]. La présence d'*E. hartmanni*, *E. polecki*, *E. coli* ne doivent pas conduire à la prescription d'un traitement. Pour *E. moshkovskii* et *E. bangladeshi*, aucune recommandation n'existe actuellement pour le traitement ou non de ces espèces.

Pour les formes symptomatiques de l'amibiase intestinale, un amoebicide tissulaire est prescrit pour traiter l'épisode en utilisant la classe pharmaceutique des 5-nitro-imidazolés (métronidazole, tinidazole, secnidazole, ornidazole). Le métronidazole est le médicament le plus prescrit à 1,5g/jour en 3 prises/jour chez l'adulte ou 30 à 40mg/kg en 3 prises/jour chez

l'enfant durant 7 jours. Ensuite un amoebicide de contact (Tiliquinol-tibroquinol, Iodoquinol, Paramomycine, Fuorate de diloxanide) est utilisé pour traiter la colonisation intestinale. Le Tiliquinol-tibroquinol est utilisé à la posologie de 2 gélules le matin et 2 gélules le soir pendant 10 jours. Un EPS de contrôle, 1 mois après traitement, doit être réalisé afin de vérifier l'efficacité thérapeutique, et l'absence de portage chronique de kystes d'*E. histolytica* [38]. Pour les formes asymptomatiques, un amoebicide de contact suffit. Il est important de traiter ces formes car il existe un risque connu de développement de maladies invasives chez ces patients. De plus le traitement permet d'éviter la dissémination des kystes qui posent un réel problème de santé publique [25].

Pour les formes tissulaires, le traitement repose sur les mêmes amoebicides. Une ponction évacuatrice du foie (si l'abcès est accessible) associée ou non à un drainage percutané doit être envisagé s'il s'agit d'un abcès volumineux (>10 cm de diamètre) sous-capsulaire, en pré-rupture ou siégeant sur le lobe gauche. Le drainage chirurgical est réservé aux formes compliquées (péritonéales, péricardiques) ou à l'échec de ponctions répétées. Le suivi est clinique, échographique et sérologique [28].

Malgré la disponibilité d'un traitement efficace, la morbidité et la mortalité associées à l'infection amibienne restent élevées. Ceci suggère que les interventions conçues pour limiter ou éliminer la maladie sont insuffisantes. [18]

Partie II - Développement de la PCR *Entamoeba* sp.

A l'heure actuelle, nous disposons de très peu d'études récentes sur l'incidence et l'implication des espèces du genre *Entamoeba* chez l'Homme dans les pays d'Europe. L'objectif de ce travail était de réaliser une étude épidémiologique du genre *Entamoeba* en France, au CHU de Toulouse. Comme vu précédemment les techniques moléculaires sont les outils à l'heure actuelle qui présentent les meilleures performances pour identifier les espèces du genre *Entamoeba*. De ce fait, nous avons souhaité mettre en place une PCR capable de détecter les huit espèces d'*Entamoeba* décrites chez l'Homme (*E. histolytica*, *E. coli*, *E. bangladeshi*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. moshkovskii*, *E. polecki*, *E. gingivalis*).

I- Revue de la littérature

Pour débiter ce travail, une revue de la littérature, a permis d'identifier les couples d'amorces déjà publiés. L'ARN ribosomique 18S est la seule séquence actuellement disponible pour certaines espèces d'*Entamoeba*. Il a été retrouvé plusieurs couples d'amorces développés à partir de cette région, qui selon les auteurs, peuvent amplifier toutes les espèces d'*Entamoeba* (Tableau 2).

Tableau 2 : Exemples des différentes amorces spécifiques d'*Entamoeba* sp. décrites dans la littérature

Amorces	Séquences (5'-3')	Sources
ENTAM 1	GTTGATCCTGCCAGTATTATATG	Verweij <i>et al.</i> , 2001
ENTAM 2	CACTATTGGAGCTGGAATTAC	[76]
542	GTTGATCCTGCCAAGTATTATATGCT	Clark <i>et al.</i> , 2006 [47]
543	GACTATTGGAGCTGGAATTACCG	
ENTAGEN_F ENTAGEN_R	ACTTCAGGGGGAGTATGGTCAC CAAGATGTCTAAGGGCATCACAG	C. Rune Stensvold <i>et al.</i> 2011 [22]
RD5	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	Clark <i>et al.</i> , 2006 [47]
RD3	ATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	
Eg-SS-F1	TGTGATTAACGCTCGTAGTTGAA	Foo <i>et al.</i> , 2012 [77]
Eg-SS-CR	CTCGTTCGTTACCGGAATTAACC	

Cependant, Alison S. Jacob *et al.* ont constaté que les amorces ENTAGEN F/R et ENTAM 1/2 étaient surtout intéressantes pour la détection et l'identification d'*Entamoeba*

provenant de culture. A partir de prélèvement de selles, la sensibilité et la spécificité des PCR utilisant ces amorces étaient considérablement diminuées [23]. Le couple d'amorces ENTAM 1/2 a été testé au laboratoire directement sur les selles de patient selon les conditions décrites par les auteurs. La Figure 5 montre les résultats obtenus avec ces amorces. Il n'y a pas eu d'amplification pour le témoin négatif B1 (H₂O). Il y a eu une amplification pour les échantillons A1 (témoin positif : selles positives à *E. dispar*), C1 (Patient 1 : selles connues positives à *E. hartmanni*) et D1 (Patient 2 : selles connues positives à *E. histolytica*). La taille attendue des séquences était de 550 pdb. Pour A1, 2 séquences ont été amplifiées (une bande d'environ 667pdb et l'autre d'environ 1100pdb) et visible après migration électrophorétique conduisant à des résultats ininterprétables après le séquençage. Les produits obtenus pour C1 et D1 étaient de 643 pdb et 616 pdb respectivement. Le séquençage de ces produits a montré une amplification non spécifique de *Saccharomyces cerevisiae*, sans aucune amplification des espèces d'*Entamoeba* attendue (*E. dispar*, *E. histolytica*, *E. hartmanni*). De plus, l'alignement des séquences d'*Entamoeba* et de *Saccharomyces cerevisiae* avec ENTAM 1/2 montre une homologie extrêmement importante entre ce couple d'amorces et *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 6). Les essais réalisés au laboratoire ont donc confirmé ce problème de spécificité dès lors que la PCR était effectuée directement sur les selles du patient.

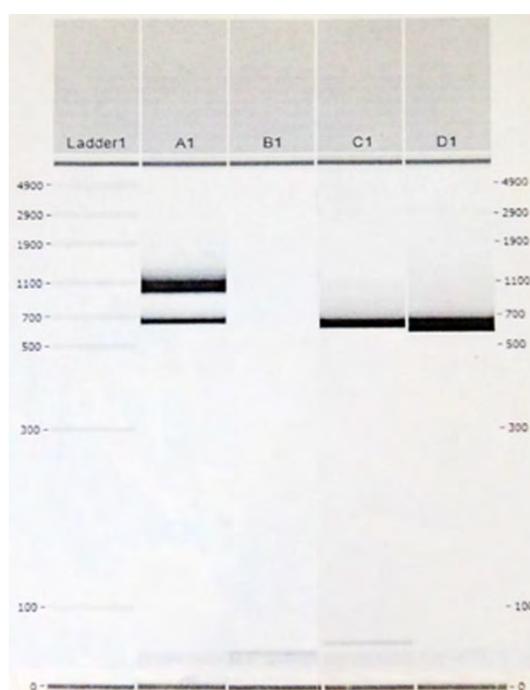


Figure 5 : Résultats de la PCR conventionnelle après migration électrophorétique testés avec les amorces ENTAM 1/2
A1 : témoin positif : selles positives à *E. dispar* / B1 : H₂O / C1 : Selles patient 1 connu à *E. hartmanni* / D1 : Selles patient 2 connu à *E. histolytica*. A1, C1 et D1 ont été passés au séquençage. La taille attendue des séquences était de 550 pdb Les bandes amplifiées pour C1 (643pdb) et D1 (616 pdb) ont donné comme résultats, *Saccharomyces cerevisiae*. Le résultat du séquençage de A1 (deux bandes : 667 pdb et environ 1100 pdb) était ininterprétable.

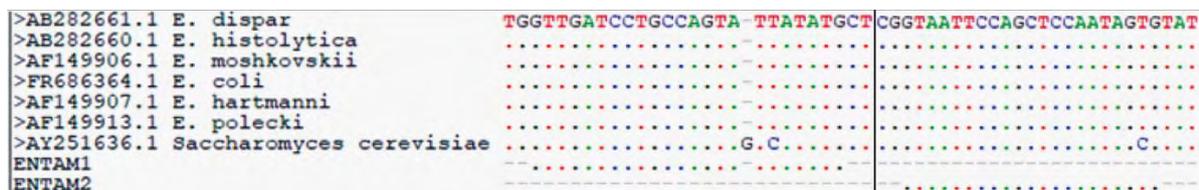


Figure 6 : Alignement des séquences ENTAM 1 / 2 avec les séquences d'*Entamoeba sp.* et avec *Saccharomyces cerevisiae*

Malgré une augmentation des températures d'hybridation, la spécificité de cette PCR n'a pu être améliorée. Ainsi, le système PCR utilisant les amorces ENTAM 1 / 2, mis en place initialement pour des cultures pures d'*Entamoeba*, apparaît inefficace sur des matrices complexes, telles que des selles, qui comprennent d'autres micro-organismes.

Un alignement des séquences d'amorces ENTAM1, R42 et RD5 avec des séquences de référence des différentes espèces d'*Entamoeba* sélectionnées dans la base de données GenBank, a montré que le design de ces 3 couples d'amorces a été réalisé sur la même zone (Figure 7). De ce fait, il est probable que les PCR utilisant les couples 542/543 et RD5/RD3 souffrent du même manque de spécificité que celle d'ENTAM 1/2.

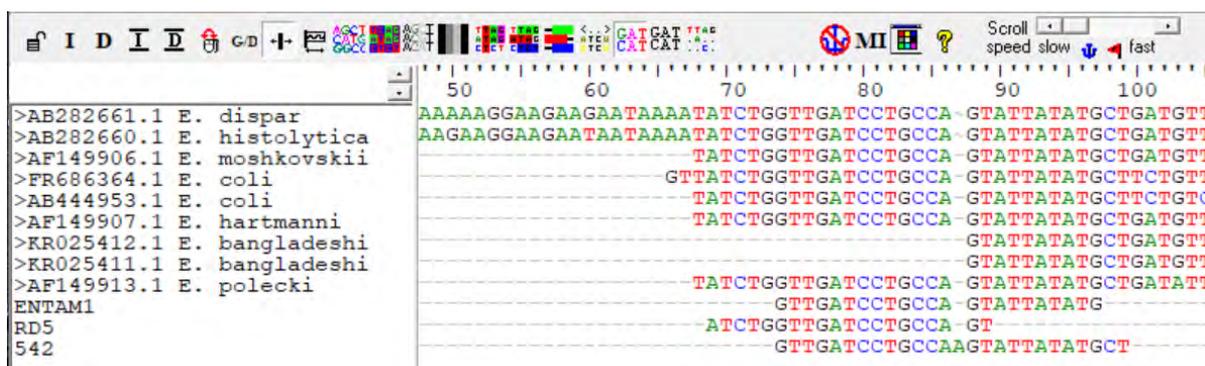


Figure 7 : Alignement des séquences sens ENTAM 1 / RD5 / 542 décrit dans la littérature avec des séquences de différentes espèces d'*Entamoeba*

Concernant la PCR utilisant le couple d'amorces Eg-SS-F1 / Eg-SS-CR1, son spectre ne comprend pas *E. polecki*, puisque l'on note une discordance importante de 3 paires de base (Figure 8).

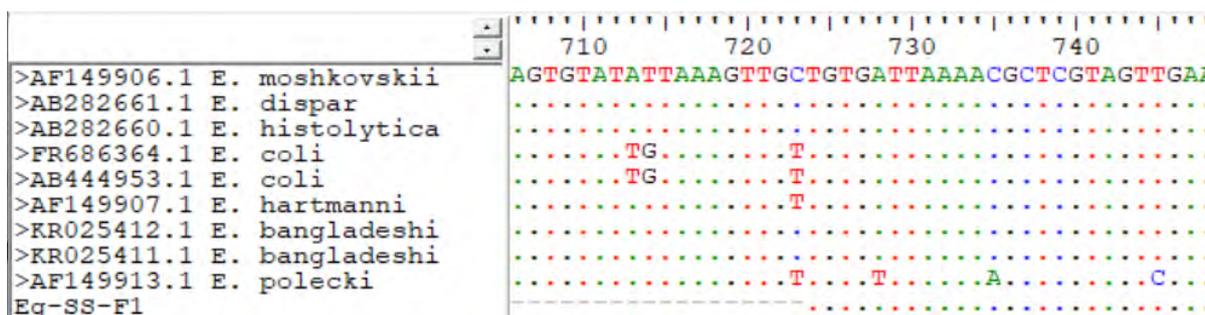


Figure 8 : Alignement des séquences sens Eg-SS-F1 avec des séquences de différentes espèces d'*Entamoeba*

Ainsi, aucun des systèmes de PCR décrits dans la littérature ne semblait adapter à nos besoins. Ces différents éléments, nous ont conduit à développer une nouvelle PCR au laboratoire du CHU de Toulouse.

II- Choix de la séquence cible

Les séquences des génomes complets ou partiels de l'ARN ribosomique 18S des différentes espèces d'*Entamoeba* ont été récupérées dans la base de données GenBank du NCBI. Pour chaque espèce, plusieurs séquences ont été sélectionnées pour tenir compte, au maximum, de la variabilité génétique des souches d'*Entamoeba*. Les séquences retenues à partir de GenBank sont présentées dans le Tableau 3

Tableau 3 : Numéro d'accession GenBank des différentes séquences d'*Entamoeba* utilisés pour le développement de la PCR *Entamoeba sp.*

Espèces	Numéro d'accession GenBank
<i>E. dispar</i>	AB282661 / KP722600 / KP722597
<i>E. histolytica</i>	AB282660 / AB426549
<i>E. bangladeshi</i>	KR025412 / KR025411
<i>E. coli</i>	FR686364 / FR686411 / FR686412 / FR686413 / FR686421 / FR686415 / FR686418 / AB 444953 / FR686444 / FR686440
<i>E. hartmanni</i>	FR686381 / FR686380 / FR686379 / FR686378 / FR686377 / FR686376 / FR686375 / FR686374 / KX618191
<i>E. moshkovskii</i>	KP722604 / KP722602 / KP722601
<i>E. polecki</i>	LC082305 / LC082304 / FR686393 / FR686357

Les séquences sélectionnées ont été analysées, alignées et comparées entre elles grâce au logiciel Bioedit (version 7.0.5.3). Plusieurs critères ont été recherchés pour choisir des zones où pourraient potentiellement s'hybrider des amorces sens et anti-sens :

- Ces zones doivent être conservées entre les différentes espèces d'*Entamoeba*.
- Elles doivent être suffisamment différentes d'autres eucaryotes que l'on pourrait retrouver dans les selles. Pour cela les séquences ont aussi été alignées avec d'autres

protozoaires (*Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Microsporidies*, *Cryptosporidium spp*, *Endolimax nana*) et des levures (*Candida sp.*)

- Les séquences amplifiées doivent présenter suffisamment de nucléotides de différences pour permettre par le séquençage de différencier les espèces d'*Entamoeba*.
- La taille de la région amplifiée ne doit pas être trop longue. Dans l'idéal elle doit être comprise entre 75 et 300pb.

III- Design des amorces

Il est important de respecter un certain nombre de critères pour dessiner des amorces :

- Une longueur d'oligonucléotides comprise entre 16 et 26 nucléotides
- Un taux de GC compris entre 40 et 70% (idéalement autour de 55%)
- Un Tm des amorces proche de 60°C avec des Tm très proche entre les amorces sens et anti-sens
- Une absence de complémentarité en position 3' pour éviter la formation de dimères

Afin de faciliter le design et le choix d'un couple d'amorce, le logiciel Primer3Plus (Version : 2.4.2) a été utilisé. Trois amorces ont été retenues FOR1, FOR2 et REV (Tableau 4), formant 2 couples d'amorces possibles (FOR1/REV ou FOR2/REV). La spécificité de ces amorces a été vérifiée sur Bioedit (version 7.0.5.3), en alignant les différentes séquences des espèces d'*Entamoeba* et les séquences d'espèces non *Entamoeba* avec les amorces sélectionnées (Figure 9 et 10). On peut constater que les amorces sélectionnées sont identiques avec les séquences des espèces d'*Entamoeba* mais présentent des différences nucléotidiques avec les espèces non *Entamoeba* sélectionnées. Pour confirmer les résultats de spécificité, les amorces ont aussi été vérifiées à l'aide du logiciel Blast du NCBI. Les résultats étant concluants, ces 2 couples d'amorces ont été retenus.

Tableau 4 : Caractéristiques principales des amorces FOR1, FOR2 et REV

Nom de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Longueur (pdb)	Tm (°C)	GC (%)
FOR 1	CAA-CAC-GGG-AAA-ACT-TAC-CAA	21	59,9	42,9
FOR 2	CAC-GGG-AAA-ACT-TAC-CAA-GAC-C	22	59,4	50
REV	CCA-AGA-TGT-CTA-AGG-GCA-TCA	21	60,1	47,6

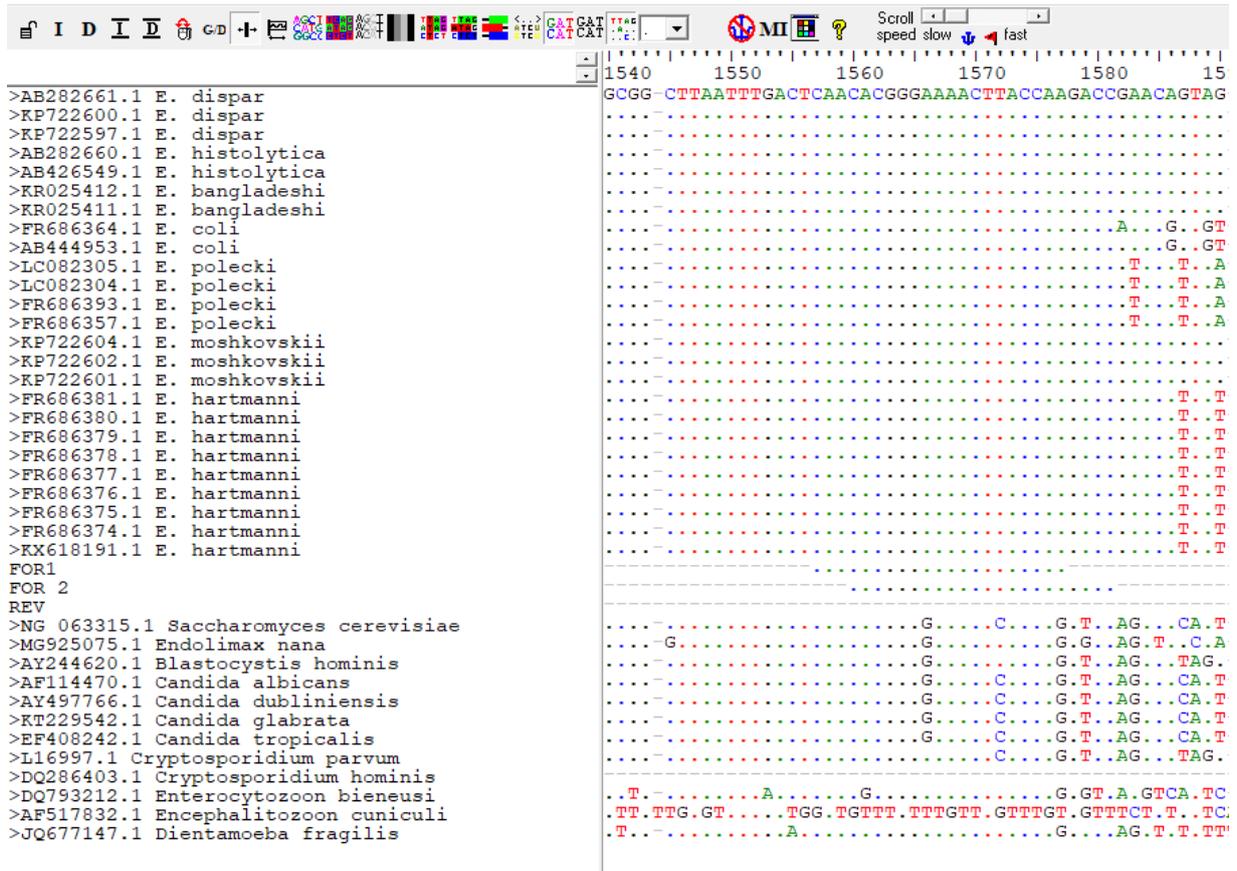


Figure 9 : Alignement sur Bioedit des différentes séquences d'*Entamoeba* et d'autres espèces non *Entamoeba* après le design des amorces sens FOR1 et FOR2

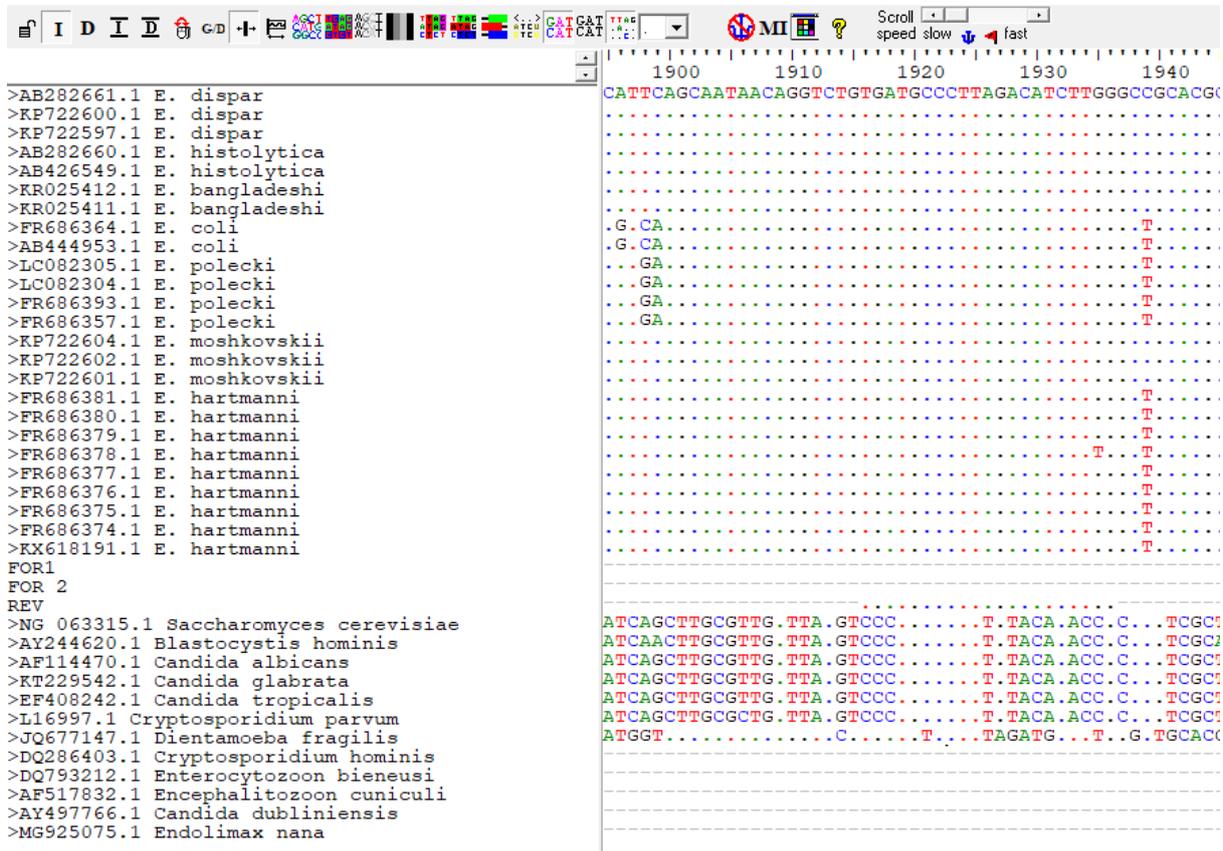


Figure 10 : Alignement sur Bioedit des différentes séquences d'*Entamoeba* et d'autres espèces non *Entamoeba* après le design de l'amorce anti-sens REV

IV- Composition du milieu réactionnel et optimisation de la PCR

La technique choisie est une PCR SYBR® Green en temps réel. Le milieu réactionnel contient de l'eau, du MgCl₂, les amorces sens et anti-sens (Eurogentec) et le Fast SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher Scientific). Ce dernier est un mix de PCR commercialisé, qui contient un tampon optimisé avec l'ADN polymérase, les dNTPs, les sondes SYBR® Green, et des UDGs.

L'objectif était de trouver le meilleur couple d'amorces, ainsi que d'optimiser les conditions de température et de concentration de MgCl₂ afin d'obtenir les meilleures sensibilité et spécificité possibles. La sensibilité et la spécificité ont été évaluées en utilisant des témoins positifs (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. coli*) mais aussi des témoins non *Entamoeba* parasites (*Cryptosporidium spp.*, *Blastocystis sp.*, *Endolimax nana*, *Dientamoeba fragilis*, *Pseudolimax butschlii*) ou fongiques (*Candida albicans*, *Geotrichum sp.*, Microsporidies). Les échantillons positifs en PCR ont ensuite été séquencés.

Les premiers tests ont été réalisés sur l'automate LightCycler 1.0 (Roche) (LC1). De meilleurs résultats ont été obtenus avec le couple d'amorces FOR2/REV plutôt que FOR1/REV. C'est donc le premier couple qui a été retenu. L'optimisation de la PCR a été réalisée en testant des gradients de concentrations différentes de MgCl₂ (2mM, 3mM, 4mM, 5mM) et de températures d'hybridation (60°C, 65°C, 68°C, 70°C). Les résultats des Ct (le Ct correspond au nombre de cycles à partir duquel un signal devient détectable) d'*E. dispar* sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Résultats des Ct d'*E. dispar* sur LC1 en fonction des concentrations en MgCl₂ et des températures d'hybridation

		Température d'hybridation (°C)			
		60	65	68	70
Concentration en MgCl ₂ (mM)	2			Ct = > 35 Spécificité non optimale	
	3	Ct = 27,21 Spécificité non optimale		Ct = 28,17 Spécificité non optimale	Ct = 28,10 Spécificité non optimale
	4				Ct = 28,32 Spécificité optimale
	5		Ct = 27,76 Spécificité non optimale		28,76 Spécificité optimale

Il est mentionné dans ce tableau si les résultats étaient spécifiques ou non, en fonction de la détection d'un signal non spécifique avec l'ADN d'autres micro-organismes non-*Entamoeba* (en courbe d'amplification et de fusion). La condition retenue a été surlignée en jaune.

Lors des différents tests sur le LC1, il a été constaté que la température et la concentration en MgCl₂ avait finalement peu d'influence sur la sensibilité de cette PCR. A l'inverse, la spécificité était non-optimale pour des températures de 60 à 68°C et des concentrations en MgCl₂ inférieure à 3mM. Une température d'hybridation à 70°C avec une concentration en MgCl₂ à 4mM a permis d'obtenir une spécificité optimale.

Un changement d'automate sur le LightCycler 2.0 (Roche) a dû avoir lieu au cours du développement. Lors du passage sur le LC2 une perte de sensibilité sur les Ct de presque 2 cycles aux mêmes conditions retenues que précédemment, a conduit à une ré-optimisation en baissant la température d'hybridation à 68°C. Cette baisse a permis de récupérer la sensibilité sans perdre en spécificité. La Figure 9 présente les résultats de détermination de la température de fusion T_m (température à laquelle 50% de l'ADN est dénaturé en monobrin) par la méthode de la dérivée seconde. Pour les conditions de cet essai (2mM MgCl₂, température d'hybridation à 68°C), l'amplification génère des pics aspécifiques, pour *Encephalitozoon sp.* et *Candida*

albicans, indiquant un manque de spécificité de la PCR dans ces conditions. La Figure 10 montre les résultats avec les conditions finales retenues, soit une température d'hybridation à 68°C avec une concentration en MgCl₂ à 4mM. Il n'y a pas de pic aspécifique. Les pics que l'on retrouve correspondent à des *Entamoeba*.

Il a été décidé de ne pas modifier la concentration en amorces durant les différents tests d'optimisation de la PCR *Entamoeba sp.* La concentration était de 0,5µM (Annexe 1).

Le programme de la PCR retenu comprend :

- 1) Une étape de dénaturation à 95°C durant 8 minutes
- 2) Une étape d'amplification comprenant 40 cycles. Le déroulé de chaque cycle est 15 sec à 95°C, 10 sec à 68°C et 20 sec à 72°C.
- 3) Une étape de fusion à 5 sec à 95°C et 20 sec à 70°C
- 4) Une étape de refroidissement

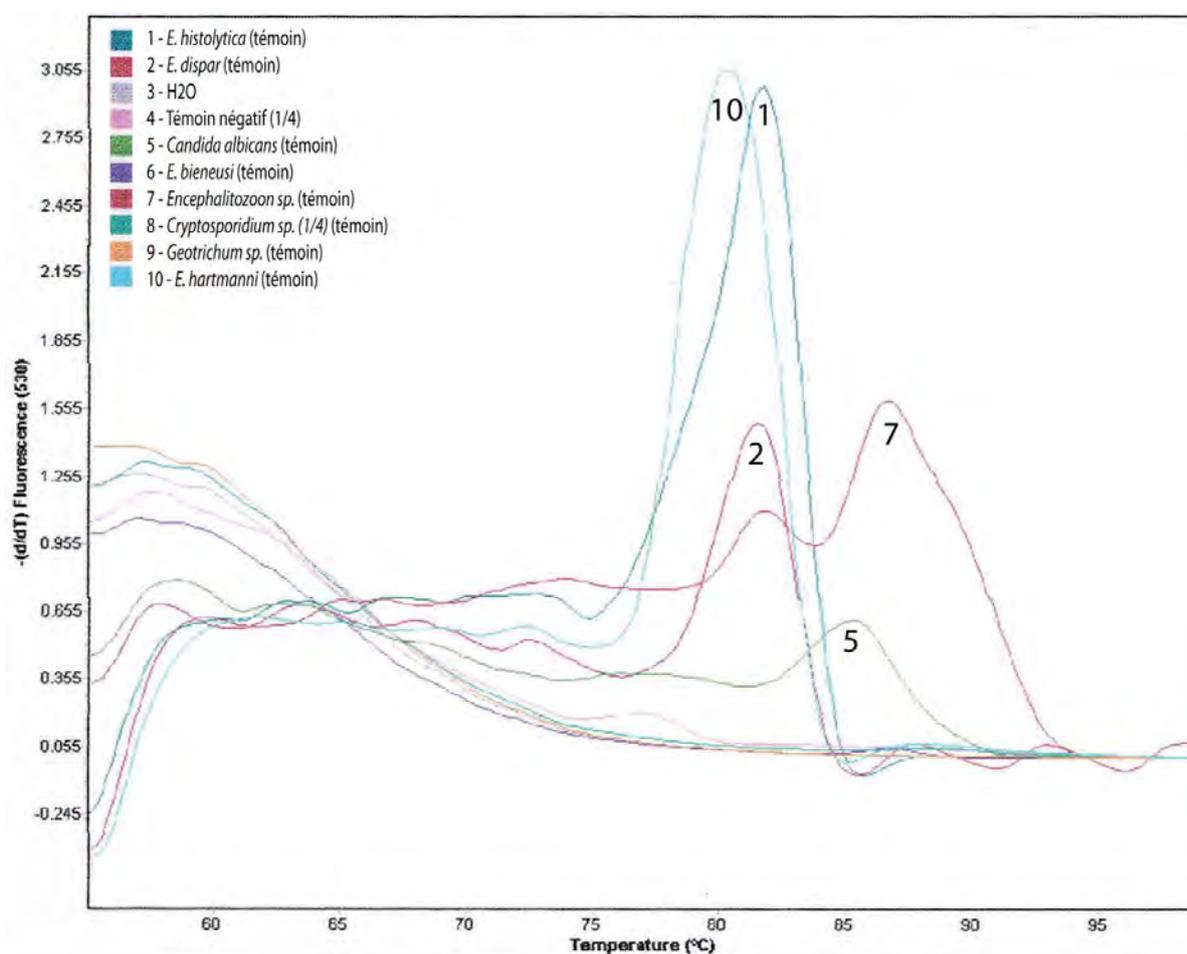


Figure 11 : Résultats des courbes de fusion représentant la dérivée seconde de la fluorescence (-dI/dT) en fonction de la température avec des conditions en MgCl₂ de 2mM et une température d'amplification de 68°C

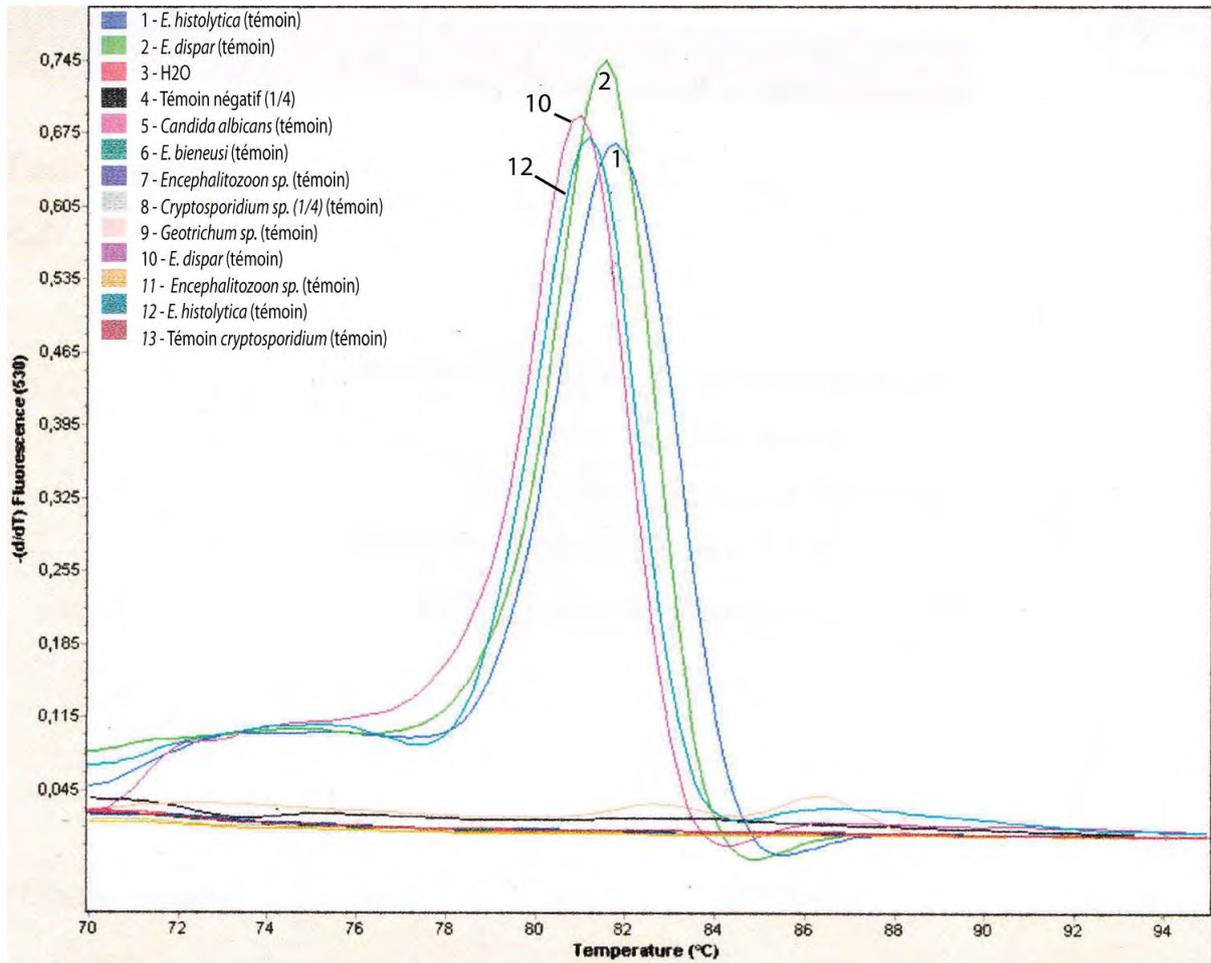


Figure 12 : Résultats des courbes de fusion représentant la dérivée seconde de la fluorescence ($-dI/dT$) en fonction de la température avec des conditions en $MgCl_2$ de 4mM et une température d'amplification de 68°C

Partie III - Etude épidémiologique

I- Introduction

Pour fournir des données épidémiologiques les plus complètes et précises possible, il est important de développer un système fiable de détection et d'identification des espèces étudiées. Les données épidémiologiques sur le genre *Entamoeba* étaient principalement obtenues grâce à la MO. Du fait du manque de sensibilité et de spécificité de cette dernière, ces résultats sont incertains et discutables. Cette technique est incapable de différencier les espèces du complexe *Eh / Ed / Em / Eb* qui sont morphologiquement indiscernables mais qui présentent des différences génétiques entre-elles. Ainsi, le développement des techniques moléculaires comme la PCR et le séquençage a ouvert la voie aux identifications et aux études épidémiologiques moléculaires, beaucoup plus fiables et précises. Ces études ont permis de réévaluer la prévalence des différentes espèces d'*Entamoeba* dont les chiffres étaient probablement erronés lorsqu'ils étaient calculés à partir de la MO.

Actuellement l'examen parasitologique des selles (EPS) à Toulouse comprend un examen microscopique qui permet d'identifier les espèces d'*Entamoeba* morphologiquement différentiable et une technique de biologie moléculaire qui permet d'identifier spécifiquement et uniquement *E. histolytica* (*Amplidiag*® Stool Parasites, Mobidiag). Lorsqu'une espèce du complexe *Eh / Ed / Em / Eb* est identifiée en MO et que la recherche d'*E. histolytica* en biologie moléculaire est négative, aucune autre technique ne permet d'identifier précisément l'espèce. A Toulouse, avec les techniques utilisées en routine, une étude d'épidémiologie moléculaire ne peut être réalisée que pour *E. histolytica*.

La question de la prévalence des différentes espèces d'*Entamoeba* s'est posée en sachant qu'aucune étude épidémiologique réalisée par biologie moléculaire n'a été à ce jour publiée en France d'après nos connaissances. Ainsi, pour y répondre, une PCR *Entamoeba sp.* a été développée et une étude d'épidémiologie moléculaire a été réalisée au laboratoire de parasitologie du CHU de Toulouse au cours de l'année 2018-2019.

II- Matériels et méthode

II-1 Design de l'étude

Cette étude rétrospective a été menée du 1er juillet 2018 au 1^{er} juillet 2019 dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse. Une recherche moléculaire d'*Entamoeba* a été réalisée par PCR sur tous les prélèvements de patients ayant bénéficié d'un examen parasitologique des selles sur cette période. Pour un patient dont plusieurs prélèvements de selles ont été reçus au laboratoire dans un intervalle de moins de quinze jours, uniquement la première selle a été retenue.

Une première investigation a d'abord été réalisée afin de connaître le niveau de prévalence de la détection d'*Entamoeba* chez les patients bénéficiant d'une recherche de parasites dans les selles au CHU de Toulouse.

Dans un deuxième temps, une étude cas-contrôle a été menée, dans le but d'identifier les facteurs de risque associés à la détection d'*Entamoeba* chez ces patients. Chaque patient détecté positif en PCR *Entamoeba* a été associé avec un patient contrôle. Ce patient contrôle était le patient ayant bénéficié d'une demande d'examen parasitologique des selles immédiatement après le cas index et qui était négatif pour la PCR *Entamoeba*.

II-2 Examen parasitologique des selles (EPS) standard

Les résultats de l'EPS des selles réalisés en routine au laboratoire comprennent :

- Un examen macroscopique qui permet d'analyser l'aspect de la selle et la présence d'éléments parasitaires ou non parasitaires (mucus, sang, etc)
- Un examen microscopique à l'état frais (+/- MIF coloration en cas de doute sur des éléments évoquant des parasites), après technique de concentration par flottation (Ovatec® Plus, Zoetis), et après technique de Baermann.
- Une PCR temps réel, permettant une détection combinée de 4 parasites (*Cryptosporidium spp.*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*) (Amplidiag® Stool Parasites, Mobidiag)

II-3 Pré-traitement et extraction de l'ADN

Les étapes de prétraitement et d'extraction de l'ADN ont été réalisées selon les procédures du laboratoire. Deux cents microlitres de suspension de selles ont été transférés dans un tube contenant des billes MagNa Lyser. Cinq cents microlitres de tampon BLB (Bacteria

Lysis Buffer, Roche) ont été ajoutés et le tube a ensuite été passé au MagNa Lyser (Roche) à 7000 tr/min pendant 70 secondes puis brièvement centrifugé. L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le kit High Pure PCR Template Preparation (Roche) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN extrait a été utilisé à la fois pour la détection multiplex *Amplidiag*® Stool Parasites dans le cadre de l'EPS et pour la PCR *Entamoeba sp.* Pour la PCR *Entamoeba sp.*, les extraits utilisés étaient conservés au congélateur à -20 ou -80°C.

II-4 PCR *Entamoeba sp.*

Les échantillons de selles sélectionnés pour l'étude ont été passés en PCR *Entamoeba sp.* Son développement au laboratoire a été décrit dans la partie II. Les amorces utilisées étaient FOR2 (CAC-GGG-AAA-ACT-TAC-CAA-GAC-C) et REV (CCA-AGA-TGT-CTA-AGG-GCA-TCA). Elles ont été reconstituées à une concentration de 100µM, stockés à -20°C et utilisées à une concentration finale de 0,5µM. Le MgCl₂ a été utilisé à une concentration finale de 4mM. Dans les capillaires, il a été ajouté 15µL de mix et 5µL d'extrait d'ADN de selles. L'ADN extrait a été amplifié par PCR en temps réel sur le LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic) en utilisant des sondes Syber-green (Fast SYBR® Green Master Mix, ThermoFisher Scientific). Comme vu dans la partie précédente, le programme de la PCR retenu comprend :

- Une étape de dénaturation à 95°C durant 8 minutes
- Une étape d'amplification comprenant 40 cycles. Le déroulé de chaque cycle est 15 sec à 95°C, 10 sec à 68°C et 20 sec à 72°C.
- Une étape de fusion à 5 sec à 95°C et 20 sec à 70°C
- Une étape de refroidissement

Un contrôle positif *E. dispar* ainsi que deux contrôles négatifs (un témoin H₂O et un témoin négatif d'ADN humain non infecté) ont été passés dans chaque série. Les capillaires positifs avec la PCR *Entamoeba sp.* ont ensuite été séquencés.

II-5 Séquençage

Les produits de la PCR *Entamoeba sp.* ont été séquencés sur le séquenceur AB 3130 XL (Applied Biosystem) en utilisant les amorces FOR2 et REV. Les séquences obtenues ont été analysées avec les logiciels CHROMAS (version 2.6.6) et BIOEDIT (version 7.0.5.3). Ensuite, elles ont été comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank en utilisant le programme BLASTN du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

II-6 Arbre phylogénétique

Un arbre phylogénétique a été construit avec le logiciel MEGA X à partir des séquences 18S dans le but de vérifier la bonne identification et d'analyser les relations phylogénétiques entre les différentes séquences. Cet arbre a été construit en suivant les différentes étapes recommandées dans l'article publié par Hall BG [78]. Les séquences des patients et les séquences utilisées comme référence par Stensvold *et al.*[22] et Alison S. Jacob *et al.*[23] (récupérées dans la banque de données GenBank) ont été alignées en utilisant l'outil d'alignement MUSCLE dans MEGA X (en utilisant les paramètres par défaut). Le modèle T92 (Tamura 3-parameter) + G (modélisation de la variation des taux entre sites par une loi gamma) + I (considération d'une fraction de sites invariable) a été retenu (utilisation de la fonction Find Best DNA/Protein Models (paramètre par défaut)). L'arbre a été créé en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood- ML). L'estimation de la robustesse de chaque nœud a été évaluée par le « bootstrap ». L'opération a été répliquée 1000 fois. Lorsqu'un bootstrap était inférieur à 50%, ce dernier n'était pas renseigné sur le nœud associé. L'enracinement de l'arbre a été réalisé avec *E. coli* comme les arbres publiés par C. Graham Clark *et al.* [47]. Ces derniers justifient ce choix d'enracinement par le fait qu'il a été précédemment montré que cette lignée émergeait à la base de l'arbre du genre *Entamoeba* [79].

II-7 Recueil de données

Pour réaliser l'étude cas-contrôle, un recueil de données démographiques, cliniques et biologiques a été réalisé sur les patients positifs en PCR *Entamoeba sp.* (cas) et les patients négatifs en PCR *Entamoeba sp.* (contrôle). Le recueil a été réalisé à partir du logiciel Molis, des comptes rendus médicaux Orbis et/ou des comptes rendus des médecins d'hôpitaux hors CHU de Toulouse.

Le recueil comprenait des données démographiques (âge, sexe, pays visités depuis 3ans, pays d'origines des patients migrants depuis leur naissance, type sexualité), des données cliniques dont la présence de signes digestifs (diarrhées liquidiennes, diarrhées dysentériques, douleurs abdominales, rectorragie, constipation, vomissement, anorexie, amaigrissement), la présence de signes généraux (fièvre, asthénie) et la notion d'immunodépression (VIH, Transplantation, autre immunodépression).

Certaines données biologiques ont aussi été recueillies, dont les résultats de l'EPS (aspect des selles, résultats examen direct, technique flottation et Baerman, PCR protozoaire Mobidiag), les résultats de la numération formule sanguine réalisée le jour même de l'EPS

(hématies, hémoglobine, leucocytes, polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, monocytes, lymphocytes et plaquettes) et la CRP.

II-8 Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SIGMA Stat1 (2.03 ; Jandel Corporation, San Jose, CA). Les données ont été exprimées sous forme de médiane avec écart interquartile [25^{ème} ; 75^{ème} percentile]. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les distributions entre deux groupes. Pour comparer les caractéristiques des patients dans chaque groupe, le test du chi carré ou le test exact de Fisher a été utilisé selon le cas. Une estimation des risques relatifs a été obtenue au moyen des odds ratios (OR) avec intervalles de confiance à 95% (IC 95%). Une comparaison a été considérée comme statistiquement significative si $P < 0,05$.

Les patients porteurs d'*E. gingivalis* ont été exclus des analyses de facteurs de risque, de même qu'*E. coli* n'a pas été séparés en sous-types.

III-Résultats

III-1 Détection des patients positifs en *Entamoeba sp.*

Un total de 1409 selles a été envoyé dans le service de Parasitologie-Mycologie sur la période d'étude. Après retrait des doublons, 1023 selles ont été incluses et analysées, provenant de 957 patients. Dans l'étude, il y avait un équilibre homme / femme avec un sex-ratio de 1,09 (500 hommes et 457 femmes). L'âge médian de la population étudiée était de 52ans IQR [29,3 ; 65,3].

La PCR *Entamoeba sp.* était positive pour 44 patients, soit une prévalence globale de 4,6% (44/957) (Tableau 6). La prévalence par espèce était de 0,7% pour *E. histolytica* (7/957), 1,3% pour *E. dispar* (12/957), 1,4% pour *E. coli* (13/957), 0,9% pour *E. hartmanni* (9/957), 0,3% (3/957) pour *E. gingivalis*. Les 3 autres espèces, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi* et *E. polecki* n'ont pas été détectées dans la population étudiée.

Tableau 6 : Résultats de la prévalence des différentes espèces d'*Entamoeba* déterminés avec la PCR *Entamoeba sp.*

Espèces détectées	Patients positifs en PCR <i>Entamoeba sp.</i>	Prévalence (%)
<i>Entamoeba sp</i>	44	4,6
<i>E. histolytica</i>	7	0,7
<i>E. dispar</i>	12	1,3
<i>E. hartmanni</i>	9	0,9
<i>E. gingivalis</i>	3	0,3
<i>E. coli ST2</i>	2	0,2
<i>E. coli ST1</i>	11	1,2
Négatif	913	/

Total de patients inclus dans l'étude N=957

La distribution des espèces d'*Entamoeba* en fonction du sexe des patients infectés a montré une prépondérance d'infection chez les hommes avec un sexe ratio (M/F) de 1,93 (27/14). La médiane d'âge des patients infectés par *Entamoeba sp.* (en n'incluant pas *E. gingivalis*) était de 34,5 IQR [26,6 ; 51,8]. En séparant les patients en groupe d'âge, il apparaissait une fréquence plus importante d'infection à *Entamoeba* entre 21 et 50 ans avec un pic entre 31 et 40 ans (Figure 13). *E. histolytica* et *E. coli* ont été retrouvées chez l'adulte et l'enfant. *E. hartmanni* et *E. dispar* ont été identifiées uniquement chez l'adulte.

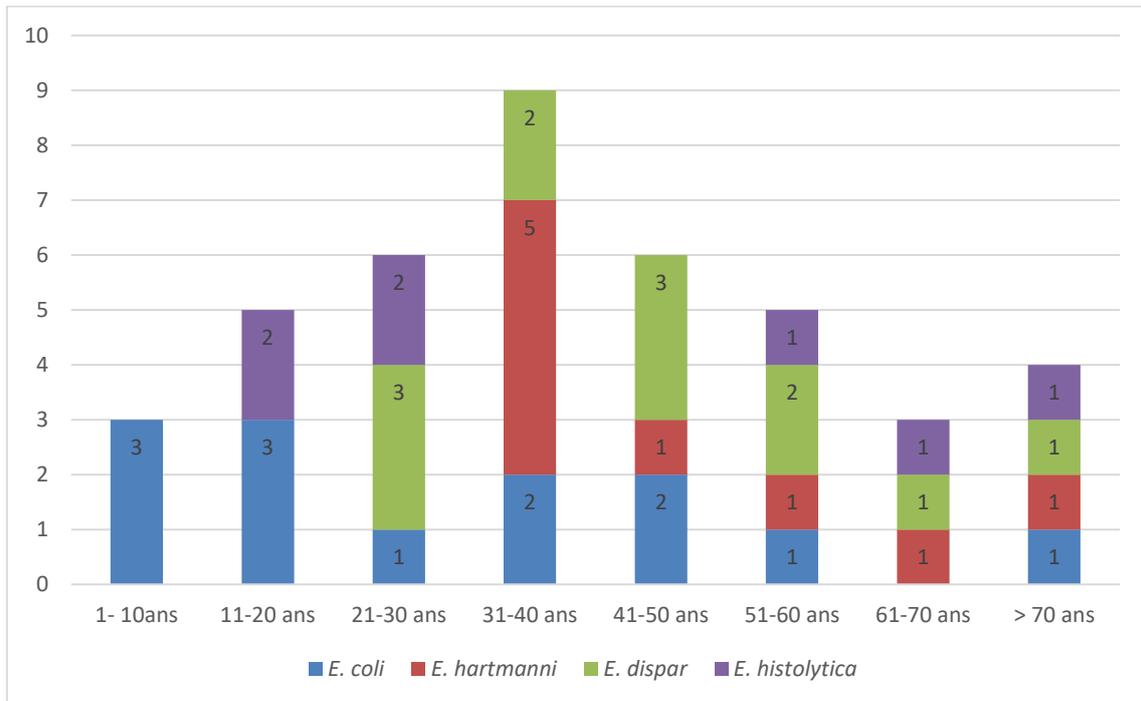


Figure 13 : Distribution des différentes espèces en fonction de l'âge des patients infectés par *Entamoeba* sp. (sauf *E. gingivalis*)

Les analyses des séquences et de l'arbre phylogénétique ont permis de mettre en évidence les deux sous-types d'*E. coli* décrit dans la littérature. ST1 était plus répandu que ST2 avec des prévalences respectives de 1,2 et 0,2% (Figure 14), (Tableau 6). Les résultats de BLAST ont montré une identité de 100% par rapport aux séquences de référence citées dans l'arbre pour la plupart des patients, sauf pour 4 :

- La séquence EP016 avait une identité de 97% avec *E. coli* strain IH96/135 (AF149914) correspondant à 9 paires de base de différence avec la séquence de référence (342/351).
- La séquence EP017 avait une identité de 97,17% avec AF149907, l'identité la plus proche est avec la séquence d'*E. hartmanni* sous le nom de FR686377 avec une identité de 97,48% (et correspondant à 8 paires de bases de différence)
- EP001 avait 2 paires de bases de différence avec la séquence de référence d'*E. hartmanni*
- La séquence EP023 présentait 97,48% d'identité avec *E. hartmanni* AF149907 mais présentait 100% d'identité avec FR686378

De plus, la séquence EP019 présentait 100% d'identité avec *E. coli* strain IH:96/135 (AB444953.1) mais aussi avec *E. muris* (FN396613.1)

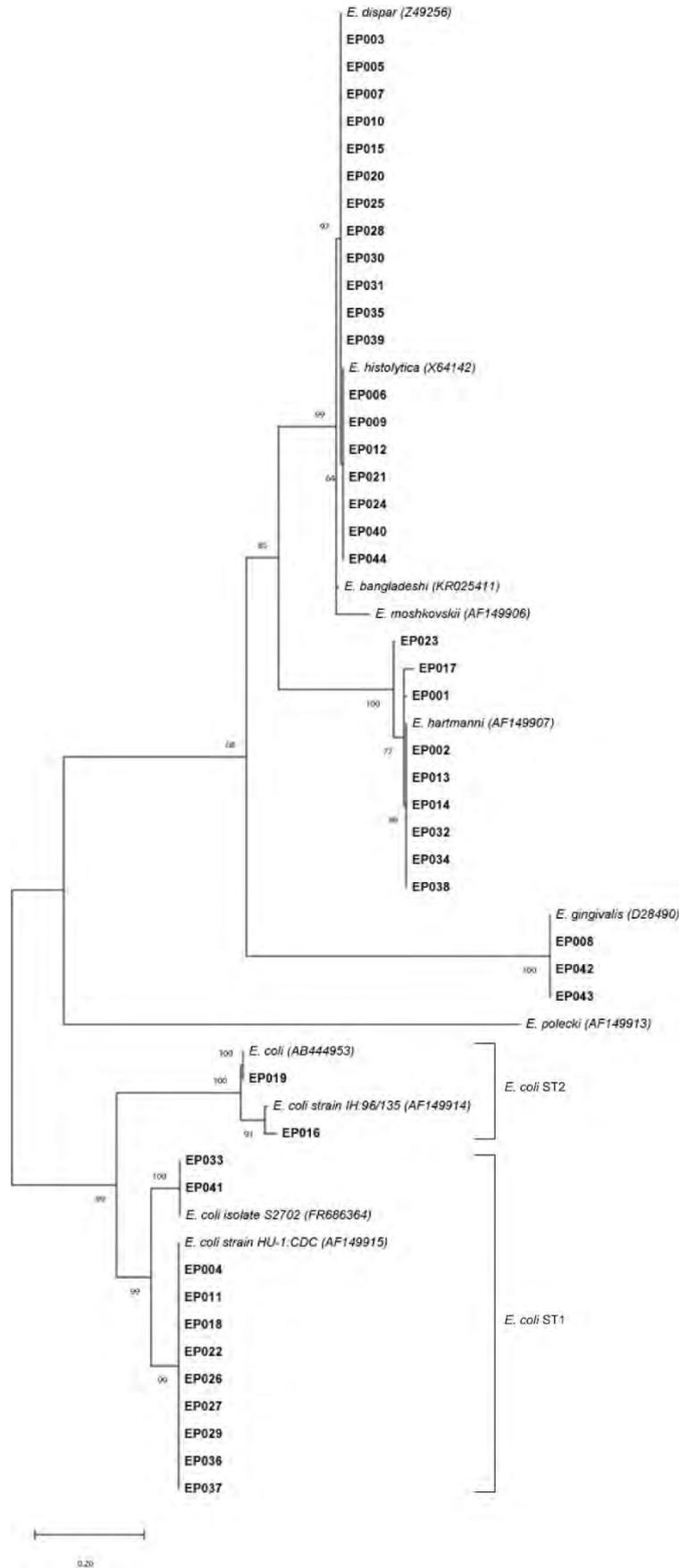


Figure 14 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences partielles de l'ARN ribosomique

Les noms EP0XX représentent les différentes séquences des *Entamoeba* détectés après amplification par la PCR *Entamoeba* sp. et après séquençage. Les autres séquences sont des séquences de référence obtenues à partir de GenBank. L'arbre a été réalisé par la méthode du maximum de vraisemblance. La robustesse des nœuds a été évaluée en réalisant 1000 répliqués de bootstrap. La barre d'échelle représente 0,20 substitutions par site.

III-2 Comparaison des méthodes de détection

Par rapport aux données obtenues au cours de l'EPS réalisés en routine, la MO présentait une faible sensibilité comparée à la PCR *Entamoeba sp.* (Tableau 7). La PCR *Entamoeba sp.* a permis d'identifier 33 patients infectés par des espèces d'*Entamoeba* non détectés par la MO. Sans tenir compte des patients positifs en *E. gingivalis*, le taux de détection d'*Entamoeba* a été multiplié par 4 grâce à la PCR (4,6% vs 1,15% pour la PCR et la MO, respectivement) ($P < 0,001$; Test du Khi2). Le défaut de sensibilité de la MO était particulièrement important pour les espèces *E. hartmanni* et *E. histolytica/dispar* avec seulement 11,1% et 10,5% de détection par rapport à la PCR *Entamoeba*, respectivement.

Pour *E. histolytica*, la technique de biologie moléculaire *Amplidiag® Stool Parasites* a permis d'augmenter la sensibilité de l'EPS pour le diagnostic de cette espèce en détectant 5 *E. histolytica* supplémentaires non vues en MO. Ces résultats ont montré aussi que la PCR *Entamoeba sp.* avait la même sensibilité pour *E. histolytica* que le système PCR *Amplidiag® Stool Parasites* pour la population étudiée.

L'identification d'espèce par MO était moins performante que la biologie moléculaire (73% d'identification morphologique correcte), bien que ces erreurs n'aient eu aucune conséquence clinique du fait de la non-pathogénicité des amibes mal identifiées. Ainsi, 3 *Entamoeba* identifiées *dispar* par séquençage, ont été diagnostiquées comme de l'*E. coli* et *E. hartmanni* en MO.

Tableau 7 : Identification des différentes espèces d'*Entamoeba* selon les différentes techniques

	Total <i>Entamoeba</i> <i>sp.</i> (n)	<i>E. coli</i> (n)	<i>E. hartmanni</i> (n)	<i>E. histolytica</i> (n)	<i>E. dispar</i> (n)	<i>E. gingivalis</i> (n)
Microscopie optique	11	8*	1*	2		0
Amplidiag® Stool Parasites	/	/	/	7	/	/
PCR <i>Entamoeba sp.</i>	44	13	9	7	12	3

n = nombre de patients détectés infectés par *Entamoeba sp.*
* Identification de 2 *E. coli* et 1 *E. hartmanni* en MO mais au séquençage il a été identifié de l'*E. dispar*

III-3 Résultats de l'étude cas/contrôle

III-3-1 Données démographiques

Il n'existait pas de différence significative entre l'âge des patients infectés par *Entamoeba sp.* (34,5 IQR [26,6 ; 51,8]) et celui des patients témoins (48,6 IQR [26,3 ; 65,7])

(P=0,21 ; test de Mann-Whitney) (Tableau 8). Cependant, en détaillant chaque espèce d'*Entamoeba* séparément, *E. coli* a été retrouvée principalement chez l'enfant et le jeune adulte (26,41 IQR [13,1 ; 47,1] ; P=0,047 ; test de Mann-Whitney). Il n'y avait pas de différence significative pour les autres espèces, *E. hartmanni* (34,8 IQR [31,9 ; 54,6], P=0,934; test de Mann-Whitney), *E. dispar* (43,38 IQR [29,6 ; 56,0], P=0,818 ; test de Mann-Whitney) et *E. histolytica* (29,7 IQR [21,0 ; 58,6], P=0,556 ; test de Mann-Whitney) par rapport aux patients témoins.

La distribution des espèces d'*Entamoeba* en fonction du sexe des patients infectés est représentée dans la Figure 15. Alors que la répartition H/F était identique chez les 44 témoins, l'infection à *Entamoeba sp* a été observée de manière prépondérante chez l'homme, sans que cela ne soit statistiquement significatif (P=0,139 ; Test du Khi2). En s'intéressant aux espèces séparément, il apparaissait que le sexe masculin était un facteur de risque d'infection à *E. dispar* (OR : 11 IC95% [1,31-92,63], P<0,01 ; Test exact de Fisher) avec 11 patients masculins infectés à *E. dispar* contre 1 patient féminin.

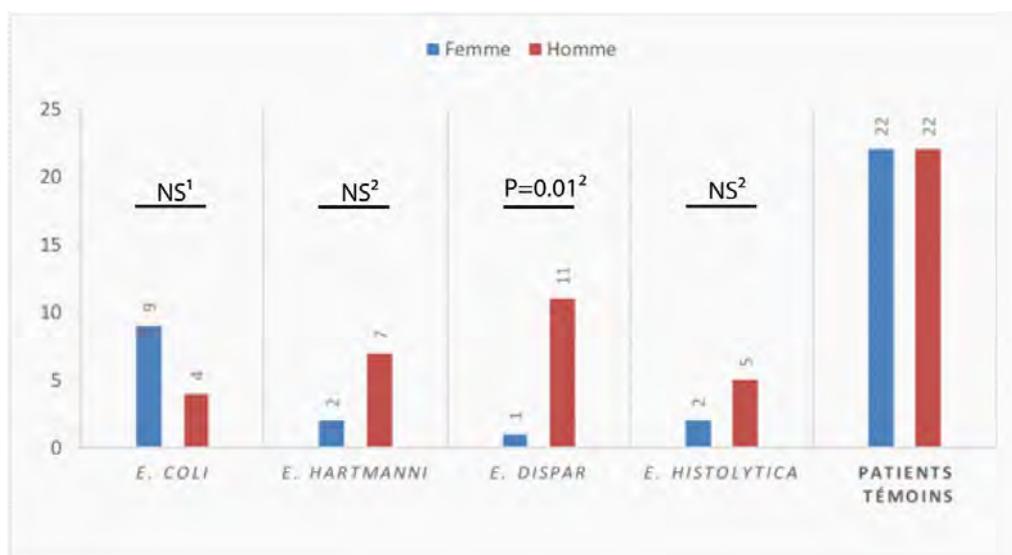


Figure 15 : Nombre de patients masculins ou féminins en fonction de l'espèce d'*Entamoeba* détectée

NS = non significatif

¹ Test de Khi2

² Test exact de Fisher

Pour l'espèce *E. dispar*, il existait aussi une tendance entre l'existence d'une infection à VIH et la détection de cette espèce (P=0,064, Test exact de Fisher). Sur les trois patients présentant cette co-infection, deux avaient déclaré qu'ils étaient homosexuels.

Dans la population positive infectée à *Entamoeba*, 22 patients avaient voyagé dans des pays hors UE et Amérique du Nord. Parmi les 9 migrants provenant de pays hors UE et

Amérique du Nord, tous étaient originaires d'Afrique. Nous n'avions pas les renseignements pour 9 patients.

Aucune association significative n'a été mise en évidence entre l'existence d'une infection à *Entamoeba sp.* et un séjour (sans considération de temps) dans une zone géographique hors UE et Amérique du Nord (P=0,439 ; Test du Khi2) (Tableau 8). En revanche, les séjours de moins de 3 ans (voyages ou immigration) dans des zones géographiques hors UE et Amérique du Nord étaient un facteur de risque d'être infecté par *Entamoeba sp.* (OR : 4,25 IC95% [1,16-15,61], P=0,024 ; Test du Khi2) (Tableau 8). En analysant chaque espèce séparément, un voyage en Asie (Sud, Sud-Est) apparaissait comme un facteur de risque d'infection à *E. histolytica* (OR : 31,5 IC95% [2,14-463,17], P=0,013 ; Test exact de Fisher) et à *E. hartmanni* (OR : 15,75 IC95% [1,29-192,47], P=0,034, Test exact de Fisher). De plus, *E. coli* était retrouvée associée de manière significative à un voyage en Amérique Centrale et du Sud (P=0,03 ; Test exact de Fisher). Il existait une tendance d'association, bien que non significative, entre l'infection à *E. dispar* et un séjour dans cette même zone géographique (P=0,064 ; Test exact de Fisher).

III-3-2 Co-infection parasitaires et/ou bactériennes associées

A partir des résultats obtenus par l'EPS, 39 % (17/44) des patients positifs à *Entamoeba* avaient une co-infection avec d'autres parasites, principalement des protozoaires. *Blastocystis hominis* s'est avéré être le parasite le plus répandu (20%), suivi de *Giardia intestinalis* (16%), *Dientamoeba fragilis* (9%), *Endolimax nana* (6,8%), *Pseudolimax butschlii* (2,2%) et *Schistosoma mansoni* (2,2%). Il a été retrouvé des co-infections avec 1 autre parasite chez 11 patients (25%), avec 2 parasites chez 4 patients (9%) et avec 3 parasites chez 2 patients (4,5%). Les patients infectés par *Entamoeba* étaient plus fréquemment co-infectés par d'autres protozoaires digestifs que les patients témoins (OR : 3,38 IC95% [1,22-9,4], P=0,017 ; Test du Khi2) (Tableau 8). En s'intéressant aux différentes espèces d'*Entamoeba* de manière indépendante, il apparaissait que cette co-infection parasitaire était principalement observée pour *E. coli* (OR : 6,17 IC 95% [1,59-23,97], P= 0,01 ; Test exact de Fisher).

Il n'y avait pas d'association significative mise en évidence entre une infection bactérienne et une infection à *Entamoeba sp.* (P=0,716 ; Test de Khi2). Cependant, l'effectif était faible car dans la majorité des cas, la coproculture n'avait pas été faite (28/44). Pour 8 patients infectés par *Entamoeba sp.*, des co-infections avec des bactéries (*Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Escherichia coli* (entéropathogène, entéroaggrégatif,

entérotoxinogène) ont été identifiées et pour les 8 autres les selles étaient négatives. La recherche de virus, pathogènes entériques n'a pas été réalisée sur ces échantillons.

III-3-3 Résultats des données cliniques et biologiques

Les données cliniques montraient une association significative entre une infection à *E. histolytica* et la présence de diarrhées dysentériques (OR : 29,25 IC95% [2,98-287,36], P=0,006 ; Test exact de Fisher), de rectorragies (OR : 8,75 IC95% [1,2-63,87], P=0,044 ; Test exact de Fisher) et de douleurs abdominales (P=0,035 ; Test exact de Fisher) (Tableau 8). De plus, l'amibiase était associée à la présence de signes inflammatoires avec une CRP > 150 mg/L (OR : 45,0 IC95% [3,1-654,9], P=0,005 ; Test exact de Fisher) associée à une polynucléose neutrophile > 7,5 G/L (OR : 20,0 IC95% [2,8-145,5], P=0,004 ; Test exact de Fisher) sans signes généraux à type de fièvre (P=0,590 ; test exact de Fisher). Le niveau des lymphocytes sanguins totaux était statistiquement inférieur dans le groupe des patients infectés par *E. histolytica*, par rapport aux patients témoins (2,1G/L IQR [1,6 ; 2,9] vs 1,4G/L IQR [1,0 ; 1,6], P=0,047 ; test de Mann-Whitney) sans que l'on ne puisse, pour autant, mettre en évidence de lymphopénie < 1 G/L dans ce groupe (P=0,411, Test exact de Fisher).

A la différence d'*E. histolytica*, aucune association significative n'a été retrouvée pour les autres espèces d'*Entamoeba non histolytica* concernant les données clinico-biologiques, par rapport aux patients témoins. On ne retrouvait pas d'association statistiquement significative entre la détection d'*Entamoeba non histolytica* et la présence de signes digestifs (P=0,309 ; Test du Khi2), à type de diarrhées (P=0,541 ; Test du Khi2), de douleurs abdominales (P=0,864, Test exact de Fisher), de rectorragies (P=0,23 ; Test exact de Fisher), d'amaigrissement (P=0,196 ; Test du Khi2), de constipation (P=1 ; Test exact de Fisher), de vomissement (P=1 ; Test exact de Fisher), d'anorexie (P=0,296 ; Test exact de Fisher). De même, aucune association significative n'a été mise en évidence avec la présence de signes cliniques plus généraux à type de fièvre (P=0,495 ; Test du Khi2) ou d'asthénie (P=0,301 ; Test du Khi2). Enfin, aucune différence significative du bilan biologique n'a été observée entre le groupe « *Entamoeba non histolytica* » et les patients contrôles, y compris sur les signes de réaction inflammatoire. En analysant chaque espèce séparément (*E. coli*, *E. hartmanni*, *E. dispar*), le constat était le même, à savoir aucune association significative avec la présence de signes cliniques ou biologiques.

Tableau 8 : Résultats de l'étude cas/contrôle

	Témoins	Patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs	P-value (témoins vs patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs)	Patients <i>E. histolytica</i> positifs	P-value (témoins vs patients <i>E. histolytica</i> positifs)	Patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs (hors <i>histolytica</i>)	P-value (témoins vs patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs (hors <i>histolytica</i>))
Données démographiques							
Age (ans)	48,6 IQR [26,3 ; 65,7]	34,5 IQR [26,6 ; 51,8]	0,21 ³	29,7 IQR [21,0 ; 58,6]	0,556 ³	34,62 IQR [26,8 ; 50,3]	0,225 ³
Sexe (M/F)	22/22	27/14	0,139 ¹	5/2	0,425 ²	22/12	0,29 ¹
Zones géographiques visité ou originaire de moins de 3 ans							
Hors UE et Amérique du Nord n/N (%)	11/20 (55)	26/31 (83,9)	0,024 ¹ OR : 4,25 IC95% [1,2-15,6]	5/5 (100)	0,123 ²	21/26 (80,8)	0,06 ¹
Afrique Subsaharienne n/N (%)	8/21 (38,1)	10/33 (30,3)	0,554 ¹	2/6 (33,3)	1 ²	8/27 (29,6)	0,537 ²
Afrique du Nord et Moyen Orient n/N (%)	2/22 (9,1)	4/32 (12,5)	1 ²	0/6 (0)	1 ²	4/26 (15,4)	0,674 ²
Asie du Sud et du Sud-Est n/N (%)	1/22 (4,6)	7/32 (21,9)	0,122 ²	3/5 (60)	0,013 ² OR : 31,5 IC95% [2,1-463,2]	4/27 (14,8)	0,362 ²
Amérique du Sud et Centrale n/N (%)	0/22 (0)	6/32 (18,8)	0,071 ²	0/6 (0)	1 ²	6/26 (23,1)	0,025 ²
Données de l'Examen Parasitologique des Selles							
Selles liquides n/N (%)	6/43 (14)	6/35 (17,1)	0,698 ¹	2/5 (40)	0,189 ²	4/30 (13,3)	1 ²
Selles liquides ou molles n/N (%)	18/43 (41,9)	19/35 (54,3)	0,274 ¹	3/5 (60)	0,641 ²	16/30 (53,3)	0,334 ¹
Résultat global EPS (hors <i>Entamoeba</i>) n/N (%)	7/44 (15,9)	16/41 (39)	0,017 ¹ OR : 3,38 IC95% [1,2-9,4]	2/7 (28,6)	0,592 ²	14/34 (41,2)	0,013 ¹ OR : 3,7 IC95% [1,3-10,7]
Résultat global EPS protozoaires* (hors <i>Entamoeba</i>) n/N (%)	7/44 (15,9)	16/41 (39)	0,017 ¹ OR : 3,38 IC95% [1,2-9,4]	2/7 (28,6)	0,592 ²	14/34 (41,2)	0,013 ¹ OR : 3,7 IC95% [1,3-10,]
Données biologiques							
Résultat de la coproculture* n/N (%)	9/18 (50)	7/16 (43,8)	0,716 ¹	2/3 (67)	1 ²	5/13 (38,5)	0,524 ¹
Hématies (T/L)	4,7 IQR [4,1 ; 4,9]	4,5 IQR [4,2 ; 5,0]	0,781 ³	4,8 IQR [4,5 ; 5,0]	0,296 ³	4,5 IQR [4,2 ; 5,0]	0,929 ³
Hémoglobine (g/dL)	13,2 IQR [10,9 ; 14,6]	13,5 IQR [12 ; 14,7]	0,396 ³	13,9 IQR [13,2 ; 14,3]	0,370 ³	13,3 IQR [11,7 ; 14,8]	0,538 ³
Leucocytes (G/L)	9,0 IQR [5,6 ; 10,7]	8,3 IQR [6,4 ; 11,5]	0,564 ³	12,6 IQR [6,2 ; 15]	0,194 ³	8,1 IQR [6,6 ; 9,7]	0,896 ³
Polynucléaires neutrophiles (G/L)	4,3 IQR [2,7 ; 6,5]	4,5 IQR [3,0 ; 7,7]	0,603 ³	9,4 IQR [4,4 ; 12,1]	0,083 ³	4,2 IQR [2,9 ; 6,1]	0,934 ³
Polynucléose (>7.5 G/L) n/N (%)	4/44 (9,1)	9/33 (27,3)	0,035 ¹ OR : 3,75 IC95% [1,04-13,5]	4/6 (66,7)	0,004 ² OR : 20,0 IC95% [2,8-145,5]	5/27 (19)	0,286 ²

	Témoins	Patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs	P-value (témoins vs patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs)	Patients <i>E. histolytica</i> positifs	P-value (témoins vs patients <i>E. histolytica</i> positifs)	Patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs (hors <i>histolytica</i>)	P-value (témoins vs patients <i>Entamoeba sp.</i> positifs (hors <i>histolytica</i>))
Polynucléaires éosinophiles (G/L)	0,1 IQR [0,05 ; 0,5]	0,2 IQR [0,05 ; 0,3]	0,914 ³	0,09 IQR [0,0 ; 0,2]	0,289 ³	0,2 IQR [0,1 ; 0,4]	0,627 ³
Polynucléaires basophiles (G/L)	0,0 IQR [0,0 ; 0,1]	0 IQR [0,0 ; 0,1]	0,918 ³	0 IQR [0,0 ; 0,0]	0,393 ³	0 IQR [0,0 ; 0,1]	0,644 ³
Lymphocytes (G/L)	2,1 IQR [1,6 ; 2,9]	2,2 IQR [1,4 ; 2,8]	0,914 ³	1,4 IQR [1,0 ; 1,6]	0,047 ³	2,4 IQR [1,6 ; 2,9]	0,511 ³
Lymphopénie (<1 G/L) n/N(%)	3/44 (6,8)	3/33 (9,1)	1 ²	1/6 (16,7)	0,411 ²	2/27 (7,4)	1 ²
Monocytes (G/L)	0,6 IQR [0,5 ; 0,9]	0,6 IQR [0,5 ; 0,9]	0,677 ³	0,9 IQR [0,6 ; 1,6]	0,194 ³	0,6 IQR [0,4 ; 0,8]	0,976 ³
Plaquettes (G/L)	267,5 IQR [213,5 ; 310,5]	275 IQR [217,0 ; 357,0]	0,603 ³	359 IQR [200,3 ; 428,3]	0,298 ³	272 IQR [219,5 ; 337,8]	0,836 ³
CRP (mg/L)	3,2 IQR [0,9 ; 24,6]	7,5 IQR [3,6 ; 90,3]	0,05 ³	201,2 IQR [86,5 ; 317,2]	0,013 ³	4,9 IQR [3,0 ; 53,0]	0,201 ³
CRP (>150mg/L) n/N (%)	2/32 (6,3)	3/24 (12,5)	0,642 ²	3/4 (75)	0,005 ² OR : 45,0 IC95% [3,1-654,9]	0/21 (0)	0,512 ²
Données cliniques							
Diarrhées liquidiennes n/N (%)	23/41 (56,1)	18/33 (45,5)	0,363 ¹	1/5 (20)	0,178 ²	14/28 (50)	0,618 ¹
Diarrhées dysentériques n/N (%)	2/41 (4,8)	4/32 (12,5)	0,394 ²	3/5 (60)	0,006 ² OR : 29,25 IC95% [3,0-287,4]	1/27 (3,7)	1 ²
Diarrhées n/N (%)	25/41 (60,9)	19/33 (57,6)	0,767 ¹	4/5 (80)	0,637 ²	15/28 (53,6)	0,541 ¹
Douleurs abdominales n/N (%)	15/38 (39,5)	14/28 (50)	0,394 ¹	4/4 (100)	0,035 ²	10/24 (41,7)	0,864 ¹
Rectorragies n/N (%)	6/41 (14,6)	4/32 (12,5)	1 ²	3/5 (60)	0,044 ² OR : 8,75 IC95% [1,2-63,9]	1/27 (3,7)	0,23 ²
Amaigrissement n/N (%)	13/37 (35,1)	5/23 (21,7)	0,271 ¹	1/2 (50)	1 ²	4/21 (19)	0,196 ¹
Constipation n/N (%)	2/41 (4,9)	1/32 (3,1)	1 ²	0/5 (0)	1 ²	1/27 (3,7)	1 ²
Vomissement n/N (%)	3/38 (7,9)	2/30 (6,7)	1 ²	0/5 (0)	1 ²	2/25 (8)	1 ²
Anorexie n/N (%)	9/35 (25,7)	4/21 (19)	0,747 ²	2/3 (66,7)	0,196 ²	2/18 (11,1)	0,296 ²
Signes digestifs n/N (%)	31/41 (75,6)	24/34 (70,6)	0,624 ¹	6/6 (100)	0,317 ²	18/28 (64,3)	0,309 ¹
Fièvre n/N (%)	10/42 (23,8)	6/29 (20,7)	0,757 ¹	2/5 (40)	0,590 ²	4/24 (16,7)	0,495 ¹
Asthénie n/N (%)	17/37 (45,9)	8/22 (36,4)	0,471 ¹	2/3 (66,7)	0,596 ²	6/19 (31,6)	0,301 ¹
Immunodépression ou autres facteurs de risque n/N (%)	14/43 (32,6)	6/37 (16,2)	0,092 ¹	1/6 (16,7)	0,652 ²	5/31 (16,1)	0,110 ¹

¹Résultats du P-value obtenus avec le test de Khi2

²Résultats du P-value obtenus avec le test de Fisher

³Résultats du P-value obtenus avec le test de Mann-Whitney

Résultats sous la forme n/N(X) : n= nombre de patients exposés sur N=nombre de patient total (X et le pourcentage de patient exposés par rapport aux nombres de patients total)

Résultats N IQR [x ; y] = médiane IQR [25^{ème} percentile ; 75^{ème} percentile]

Les OR ont été calculés lorsque le P-value était significatif avec une valeur P<0,05 OR : X IC95% [y-z] = odds ratio IC95% [intervalle de confiance borne inférieure-intervalle de confiance borne supérieure].

* Les protozoaires identifiés (hors *Entamoeba*) sont : *Blastocystis hominis*, *Giardia intestinalis*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Pseudolimax butschlii* et les bactéries identifiées en coproculture sont : *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Escherichia coli* (entéropathogène, entéroaggrégatif, entérotoxigène, entérohémorragique)

IV-Discussion

IV-1 Comparaison de la PCR *Entamoeba sp.* avec les autres techniques utilisées en routine dans le cadre de l'EPS

Cette étude a permis de confirmer la supériorité en termes de performances analytiques de la PCR par rapport à la MO, pour la détection et l'identification des espèces du genre *Entamoeba*. Les 3 erreurs d'identifications commises en MO montrent bien que la frontière morphologique entre les différentes espèces est parfois étroite et qu'il est, dans certains cas, difficile d'identifier l'espèce avec certitude. Des variations génétiques chez *E. coli* peuvent produire des kystes plus petits et immatures, pouvant être confondus avec une espèce du complexe *Eh / Ed / Em / Eb* [40]. De même des confusions morphologiques sont possibles entre *E. hartmanni* et ce complexe [40]. La PCR a aussi permis de détecter 4 fois plus d'*Entamoeba* qu'en MO et toutes les amibes observées en MO, ont été détectées en PCR. Les résultats de prévalence des espèces d'*Entamoeba sp.* obtenus grâce à la PCR sont donc plus robustes, plus précis et plus fiables que ceux apportés grâce à la MO.

Les deux techniques de biologie moléculaire (Amplidiag® Stool Parasites et la PCR *Entamoeba sp.*) ont montré pour *E. histolytica* des performances identiques et meilleures qu'avec la MO, ce qui met en avant l'intérêt des outils moléculaires en routine pour la détection de cette espèce, responsable de l'amibiase. A Toulouse, dans le cadre de l'EPS réalisé en routine, la technique Amplidiag® Stool Parasites a permis d'identifier 5 *E. histolytica* supplémentaires qui n'avaient pas été vu en MO permettant une prise en charge adéquate de ces patients.

IV-2 Séquençage et phylogénie des *Entamoeba*

Concernant *E. hartmanni*, de petites variabilités génétiques sont apparues chez des patients présentant quelques paires de base de différence par rapport aux séquences de référence GenBank. C'était surtout le cas pour le patient EP017 où la meilleure identité était de 97,48% avec la séquence de référence FR636877. L'arbre phylogénétique (Figure 14) permet cependant de montrer que la séquence identifiée fait partie du même clade que les autres séquences identifiées comme de l'*E. hartmanni*. Les variabilités génétiques concernant cette espèce restent cependant faibles comme l'ont démontré Clark CG *et al.* et C. Rune Stensvold *et al.* [80] [22]. De la même manière, pour le patient EP016, une identité

de seulement 97% avec *E. coli strain IH : 96/135* (AF149914) a été mise en évidence, même si cette souche semble néanmoins appartenir au clade d'*E. coli*.

Dans notre étude, la souche d'*E. coli* ST1 était plus fréquente que la souche ST2 (11 ST1 contre 2 ST2), ce qui correspond aux études déjà publiées [40]. Le sous-type ST1 a été retrouvé uniquement chez l'Homme et ST2 a été décrit chez les Hommes et chez d'autres espèces non humaines [22]. La séparation de ces deux sous-types en espèces distinctes est discutée du fait de ces importantes variations génétiques. Cependant, il n'y a pas de données suffisantes à l'heure actuelle pour justifier ce choix [22]. Un résultat étonnant concernait le patient EP019, qui présentait 100 % d'identité avec *E. coli* (AB444953), mais aussi avec *E. muris* (FR396613). Alison S. Jacob, *et al.* considère qu'il y a qu'une séquence fiable d'*E. muris* sous le nom (AB445018). L'autre séquence d'*Entamoeba muris* (FR396613) qui a été isolée du rat (*rattus rattus*) est probablement mal identifiée à cause de l'hôte [23], ce qui expliquerait ce résultat chez notre patient.

IV-3 Prévalence des *Entamoeba*

La prévalence globale de la détection d'*Entamoeba sp.*, au niveau digestif chez les patients ayant bénéficié d'un EPS au CHU de Toulouse en 2018-2019 est faible (4,6%). 5 des 7 espèces présentes chez l'Homme (*E. coli*, *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. dispar* et *E. gingivalis*) ont été détectées et identifiées parmi les 44 patients positifs. Les prévalences de ces espèces étaient assez proches entre elles 1,4%, 0,7%, 0,9% et 1,2% pour *E. coli*, *E. histolytica*, *E. hartmanni*, et *E. dispar* respectivement. Le taux de prévalence global est inférieur à ceux observés dans les pays en voie de développement probablement par le fait que la France est un pays industrialisé qui possède des méthodes d'hygiène et des systèmes d'assainissement des eaux performants, permettant de contrôler la transmission massive des infections liées au péril fécal. Dans les pays développés, les observations épidémiologiques décrivent que les infections à *Entamoeba sp.* concernent principalement certains groupes de populations (les migrants et les personnes voyageant en zone d'endémie, les homosexuels masculins, les séropositifs pour le VIH et les personnes institutionnalisés) [8].

Dans cette étude, des résultats surprenants ont été obtenus concernant la détection de 3 *E. gingivalis* dans 3 selles de femmes âgées de 48, 71 et 72 ans (prévalence de 0,3%). Aucune publication ne décrit l'identification de cette espèce dans les selles de patients. Cette espèce est principalement retrouvée dans la cavité buccale de l'Homme [5]. De rares cas de la détection de cette amibe sur des frottis cervico-vaginal de patientes ont été rapportées. Ces

femmes portaient un dispositif intra-utérin et avaient souvent une infection bactérienne concomitante [81] [82]. Sans pour autant affirmer avec certitude d'où provient l'ADN d'*E. gingivalis* détecté, dans notre étude, par la PCR *Entamoeba sp.*, on peut supposer qu'il correspond à de l'ADN résiduel de cette espèce qui aurait transité dans le tube digestif des patients. La contamination génito-anale ne peut cependant être totalement exclue. La présence de ces 3 cas dans l'étude, interroge sur la prévalence de cette espèce. Dans la cavité buccale, *E. gingivalis* est principalement retrouvée chez des personnes atteintes de parodontite [5]. Les maladies parodontales graves sont fréquentes, figurant au onzième rang des maladies les plus répandues dans le monde, en 2016 [83]. Elles touchent aussi bien les patients des pays développés ou en voie de développement. Aux USA, entre 2009 et 2012, 46% des adultes âgés de 30 ans souffraient de parodontite et cette prévalence augmente avec l'âge [84] [85]. En France, dans une étude de Bonner M *et al*, 80,6% (58 /72) des poches parodontales analysées par biologie moléculaire, contenaient de l'*E. gingivalis* contre 33,3% (11 /33) pour les échantillons prélevés au niveau de sites sains [86]. La prévalence de cette espèce est donc élevée. Cette espèce, est souvent comparée à *E. histolytica* par sa capacité à phagocyter des cellules. Bonnet *et al.* propose que cette espèce soit reconsidérée comme un agent potentiel contribuant à la physiopathologie des parodontites [5]. Cette espèce mérite ainsi l'attention de la communauté scientifique pour que de plus amples études soient réalisées.

Une co-infection parasitaire (autres qu'*Entamoeba*) associée à la présence d'*Entamoeba* a été mise en évidence chez 39% des patients contre 16% chez les patients témoins. La majorité de ces parasites retrouvés associés aux *Entamoeba* étaient des protozoaires [*Blastocystis hominis* (20%), *Giardia intestinalis* (16%), *Dientamoeba fragilis* (9%), *Endolimax nana* (6,8%), *Pseudolimax butschlii* (2,2%)] qui partagent le même mode de transmission lié au péril fécal que les espèces d'*Entamoeba*. Dans les régions où les conditions d'assainissements et d'hygiène sont précaires, ces espèces peuvent être présentes avec des taux de prévalence élevés [34] [66] [87].

Aucun cas de co-infection entre plusieurs espèces d'*Entamoeba* n'a pu être identifié alors que plusieurs études mettent en évidence ces co-infections dans les zones d'endémies (6,1% de co-infections au Yémen [56] ou 2,3% en Afrique du Sud [33]). La PCR *Entamoeba sp.*, associée au séquençage des échantillons positifs, ne permet théoriquement pas de mettre en évidence des doubles infections à *Entamoeba*, d'autant plus s'il y a une disproportion importante entre chacune des espèces présentes. Cependant, les résultats de la courbe de

fusion peuvent permettre de suspecter une co-infection en cas de présence d'une asymétrie ou d'un double pic, ce qui n'a pas été le cas pour les patients positifs. De même, en cas de présence de 2 espèces d'*Entamoeba* dans des proportions sensiblement identiques, le séquençage mettrait en évidence une double matrice rendant celui-ci difficilement interprétable, ce qui n'a pas été le cas dans cette étude.

IV-4 Zones géographiques

Depuis une trentaine d'années, les données de prévalence et de morbidité obtenues avec les outils moléculaires permettent de définir des zones d'endémies plus précises pour l'amibiase à *E. histolytica* [24]. Il est mentionné que les zones d'endémies principales sont l'Asie du Sud et du Sud-Est, l'Afrique, l'Amérique Centrale et du Sud et le Moyen-Orient [24]. Cependant, pour les autres espèces, même si l'on peut penser que les zones d'endémies se superposent avec celles d'*E. histolytica*, elles ne sont pas clairement définies dans la littérature. Dans l'étude cas/témoin que nous avons menée, il a été identifié que les voyages/migrations depuis moins de 3 ans hors UE et Amérique du Nord, étaient un facteur de risque d'être infecté par *Entamoeba sp.* Ce facteur de risque lié à la notion de voyage récent, pourrait expliquer le taux plus important d'infections observées chez les patients âgés de 20-50 ans. En effet, même si toutes les classes d'âge voyagent, les déplacements à l'étranger sont plus importants dans la tranche d'âge « 25 à 50 ans » [88]. De plus, selon une étude de l'Institut National d'Etudes Démographiques de 2016, la majorité des migrants en France sont âgés de 18 à 34 ans [89].

Statistiquement, il a été retrouvé des associations différentes entre les zones géographiques et les espèces d'*Entamoeba*. *E. coli* présente des taux de prévalence élevés dans beaucoup de régions du monde. Elle apparaît même très souvent comme l'espèce d'*Entamoeba* ayant la prévalence la plus élevée. Dans l'étude menée au CHU de Toulouse, *E. coli* était l'espèce la plus détectée avec 13 patients « infectés ». Les voyages en Amérique Centrale et du Sud étaient associés significativement à la détection de cette espèce. Les patients avaient voyagé au Mexique, Chili, Pérou ou Brésil. Une étude brésilienne, menée dans 4 communautés rurales chez des patients asymptomatiques, confirme la forte prévalence d'*E. coli* dans ce pays s'élevant à 11,2% (24/213) en MO. Ce pourcentage était plus important que la prévalence globale obtenue par biologie moléculaire pour *E. histolytica* / *E. dispar* / *E. moshkovskii* ainsi qu'*E. hartmanni* qui était de 10,9% (22 /113) [90]. Cependant, *E. coli* a aussi été identifiée avec de fortes prévalences dans d'autres zones

géographiques, comme au Kenya [73] ou en Indonésie [34] avec des taux de prévalence déterminés par biologie moléculaire de 39,1% et de 44,4% respectivement.

Les voyages en Asie du Sud et du Sud-Est étaient un facteur de risque d'être infectés par *E. hartmanni*. Dans cette zone, les patients avaient voyagé en Indonésie ou au Pakistan. En Indonésie, une étude moléculaire chez des enfants asymptomatiques, a montré un taux de prévalence élevé de 31,3% pour cette amibe [34].

E. histolytica a été aussi retrouvée associée aux voyages en Asie du Sud et du Sud-Est. Les patients avaient voyagé en Inde, au Bangladesh ou en Indonésie, zones géographiques considérées comme hautement endémiques pour cette espèce. Dans une étude de Haque R *et al.* menée au Bangladesh, 33,3% des enfants âgés de 2 à 5 ans avaient une sérologie positive à *E. histolytica* [55]. Dans des populations du Nord de l'Inde, des taux de prévalence élevés de 13,7%, déterminée par biologie moléculaire, ont été retrouvés pour cette espèce [91]. Les autres zones considérées comme endémiques pour cette espèce n'ont pas été identifiées comme des facteurs de risque dans notre étude.

Aucun patient n'a été identifié comme infecté par *E. polecki*, *E. moshkovskii* et *E. bangladeshi*. *E. polecki* a une prévalence faible au niveau mondial, avec peu de cas décrits dans la littérature alors qu'elle est connue depuis 1912 [12] [39]. Les données épidémiologiques d'*E. bangladeshi* sont actuellement très limitées (Afrique du Sud et Bangladesh) mais les taux de prévalence peuvent être importants comme en Afrique du Sud où elle est de 4,75% [33]. Etant donnée la potentielle pathogénicité d'*E. moshkovskii*, il était aussi intéressant de connaître la prévalence de cette espèce parmi les patients pris en charge dans notre centre. Alors que cette espèce a été décrite dans de nombreux pays (Bangladesh [65], Inde [30], Australie [29], Malaisie [67], Iran [68], Tanzanie [69], Tunisie [70], Thaïlande [71]) et parfois avec des prévalences élevées (18,3% au Yémen [56] ; 25,4% en Colombie [66]), aucun patient n'en était porteur dans notre cohorte. En Europe occidentale, *E. moshkovskii* a aussi été identifiée en Italie dans des boues d'épurations, mais pas chez l'Homme [72].

IV-5 VIH / homosexualité masculine

Les données de notre étude ont montré une association significative entre le sexe masculin et la détection digestive d'*E. dispar*. Une analyse plus fine a retrouvé une tendance forte, mais non significative (faible effectif), entre la présence de cette espèce et l'infection

par le VIH. Plus que l'infection VIH elle-même, il est probable que l'homosexualité masculine soit le facteur principal associé à la détection de cette espèce. En effet, 2 des 3 patients VIH positifs de l'étude, avaient déclaré leur homosexualité au cours de l'interrogatoire clinique. Cependant, ces données sont à interpréter avec prudence, étant donné l'effectif très faible de patients pour lesquels le type de sexualité a été notifié dans les comptes rendus.

Dans la littérature, le VIH est parfois considéré comme un facteur de risque d'être infecté par *Entamoeba sp.* mais ces résultats sont controversés. Dans une étude menée à Taiwan, les patients homosexuels infectés par le VIH présentaient un risque d'amibiase significativement plus élevé [92]. Au Japon, la séroprévalence à *E. histolytica* a augmenté au cours de ces dernières années chez les patients VIH positifs, dont la majorité était des homosexuels masculins [61]. Il apparaît ainsi difficile d'affirmer que le VIH à lui seul, augmente le risque d'être infecté par *Entamoeba sp.* En effet, les études s'intéressant à ce sujet, incluent des patients VIH, patients parmi lesquels les homosexuels masculins sont souvent surreprésentés, constituant un biais d'interprétation. A l'inverse, une étude menée au Kenya chez des enfants, a montré que les prévalences d'*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. coli* et *E. hartmanni* étaient inférieures chez les enfants VIH positifs par rapport aux enfants VIH négatifs (*E. histolytica* 0% / 0,9% ; *E. dispar* 3,3% / 5,4% ; *E. coli* 26,8% / 51,4% et *E. hartmanni* 14,6% / 27,9%) [73]. Il est donc probable que la détection digestive d'*Entamoeba* soit majoritairement associée aux pratiques homosexuelles masculines, plus qu'à l'infection à VIH.

L'homosexualité, quant-à-elle, est un facteur de risque clairement identifié d'infection à *Entamoeba* via les rapports sexuels oro-anaux [24]. Une étude Australienne a montré que l'infection à *E. moshkovskii* était augmentée chez les populations homosexuelles masculines, quel que soit le statut VIH [60].

Les 3 patients qui ont déclaré qu'ils étaient homosexuels dans notre étude, étaient infectés par des *Entamoeba* non pathogènes (*E. dispar* et *E. coli*). La transmission d'*E. histolytica* est aussi possible via les rapports oro-anaux [93]. De rares cas ont été rapportés dans la population hétérosexuelle. En France, deux cas d'amibiases de transmission possiblement hétérosexuelle ont été publiés. A Grenoble, un cas d'amibiase hépatique a été décrit chez un homme de 27 ans n'ayant jamais voyagé en zone d'endémie. En revanche, il avait eu des rapports sexuels non protégés avec une partenaire d'origine sud-africaine [94].

Cependant sa partenaire n'a vraisemblablement pas été dépistée pour *E. histolytica*. Un autre cas d'amibiase intestinale et hépatique a été identifié chez un homme de 67 ans n'ayant jamais voyagé. Sa compagne avait eu des rapports hétérosexuels avec un homme présentant aussi une amibiase intestinale [95]. Même si ces cas restent exceptionnels, il est important de garder à l'esprit qu'il peut exister un mode de contamination oro-anal de cette maladie, pouvant occasionner des diarrhées dysentériques et des abcès hépatiques chez des personnes n'ayant pas forcément voyagé en zone d'endémie.

Finalement, l'infection par des *Entamoeba* lors de rapports sexuel oro-anaux peut être considérée comme une infection sexuellement transmissible. La question d'un dépistage des partenaires sexuels ayant des pratiques oro-anales peut ainsi être posée. Des études supplémentaires sur ce mode de contamination doivent être réalisées pour estimer la prévalence des infections à *Entamoeba sp.* principalement chez les homosexuels masculins.

IV-6 Signes cliniques et biologiques

E. histolytica est responsable de l'amibiase. Comme attendu, la pathogénicité de cette espèce a clairement pu être mise en évidence dans cette étude, aussi bien au niveau clinique que biologique. Dans le groupe de patients infectés par *E. histolytica* les signes cliniques classiquement observés au cours de cette infection, à type de diarrhées dysentériques, de douleurs abdominales et de rectorragies étaient effectivement statistiquement plus fréquents que chez les patients témoins. Ces patients présentaient aussi des signes biologiques de réaction inflammatoire avec une CRP souvent très élevée (>150mg/L) et une fréquente polynucléose (>7,5G/L).

L'étude cas/témoins avait aussi pour objectif de voir si des signes cliniques ou biologiques pouvant évoquer une potentielle pathogénicité, étaient associés à la détection digestive des *Entamoeba* non *histolytica*. En effet, ces espèces sont considérées par la communauté scientifique comme commensale du tube digestif. Cependant, quelques études remettent en cause ce paradigme. *E. dispar* serait capable de produire des lésions intestinales chez les animaux [36] et *E. hartmanni* était associée à des diarrhées légères chez des adolescents en Indonésie [34]. Dans notre étude aucune association entre la présence d'*Entamoeba* non *histolytica* et l'existence de signes cliniques ou biologiques n'a pu être mis en évidence par rapport aux patients témoins. Ces résultats s'ajoutent à la liste des études qui décrivent ces espèces comme des commensales non pathogènes du tube digestif.

IV-7 Points forts et points faibles de l'étude

Un des points forts de cette étude est le grand nombre d'échantillons de selles étudiés (1023 provenant de 957 patients), sur une période de 1 an. De plus, cette étude présentait un caractère exhaustif puisque tous les patients, quel que soit leur âge ou leur sexe étaient inclus. Tous ces échantillons ont été passés en PCR *Entamoeba sp.* et ce, quel que soit le résultat de la MO, permettant d'obtenir des résultats précis de la prévalence globale dans la population étudiée. Ceci constitue ainsi un atout de ce travail, par rapport aux études qui évaluent des prévalences en réalisant une technique de biologie moléculaire uniquement sur des échantillons positifs en MO [29]. Dans la plupart de ces publications, les résultats de la prévalence globale dans la population étudiée sont donc sous-estimés. De plus, la PCR *Entamoeba sp.* mise au point pour cette étude, a l'avantage de pouvoir identifier toutes les espèces présentes chez l'Homme. Dans de nombreuses études, la détection par biologie moléculaire porte très souvent uniquement sur *E. histolytica*, *E. dispar* voire *E. moshkovskii* et plus récemment *E. bangladeshi* [33]. La recherche des autres espèces *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki* est rarement réalisée, ces espèces étant considérées comme non pathogènes [18]. Lorsque ces espèces sont malgré tout recherchées, c'est le plus souvent par MO avec les inconvénients décrits précédemment [66] [96]. Un autre avantage majeur de l'approche utilisée dans ce travail est d'avoir un outil moléculaire exhaustif, capable de détecter et d'identifier avec les mêmes performances, toutes les espèces d'*Entamoeba* rencontrées chez l'Homme. Cependant, cette étude ne permet pas de déterminer la prévalence globale des différentes espèces d'*Entamoeba* dans la population générale de la région. Elle se limite uniquement aux patients ayant bénéficié d'un EPS, donc des patients présentant généralement des signes cliniques digestifs.

Concernant l'étude cas-témoin, il s'agit d'une étude rétrospective, impliquant, de fait, des biais liés à la non-exhaustivité du recueil. Certaines informations sont parcellaires (pratiques sexuelles, conditions de séjours dans les zones endémiques) ne permettant qu'une exploitation partielle des résultats.

Conclusions et perspectives

Cette étude permet d'apporter des premiers résultats dans la région Toulousaine sur la prévalence des différentes espèces d'*Entamoeba* décrites chez l'Homme et complète les rares études sur ce sujet dans les pays occidentaux. Les bonnes performances de la PCR *Entamoeba sp.* couplée au séquençage ont permis de mener une étude épidémiologique plus exhaustive et fiable qu'avec les seuls outils de microscopie optique. La prévalence parmi les patients ayant bénéficié d'un EPS est faible. La détection d'*Entamoeba* concerne principalement les voyageurs ou migrants de zones d'endémies. Dans une moindre mesure, des infections chez des homosexuels masculins ont été observées. Les co-infections fréquentes avec d'autres protozoaires intestinaux ont été mises en évidence chez les patients infectés par *Entamoeba sp.*

La pathogénicité d'*E. histolytica* a été mise en évidence dans cette étude par l'association avec des signes digestifs et un syndrome inflammatoire. En revanche, aucun signe clinique ou biologique en faveur d'une pathogénicité d'*E. coli*, *E. hartmanni* et *E. dispar* n'a été retrouvé. Aucun patient infecté par *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi* et *E. polecki* n'a été identifié. Enfin l'ADN d'*E. gingivalis* détecté provient très certainement de la cavité buccale des patients.

La biologie moléculaire apporte des avantages certains pour le diagnostic de l'amibiase, pathologie qui occupe le troisième rang des maladies parasitaires les plus meurtrières au monde. La PCR a nettement amélioré le diagnostic de cette pathologie et a permis une meilleure prise en charge des patients. Cependant, dans les zones d'endémies, le coût, les ressources matérielles et la nécessité d'un personnel qualifié sont de réels obstacles à son utilisation en routine.

De nombreuses autres études seront nécessaires aussi bien dans les pays développés qu'en voie de développement, mais aussi chez les populations homosexuelles et les patients VIH positifs dans le but d'approfondir les connaissances dans le genre *Entamoeba*.

ANNEXE

Annexe 1

MIX *Entamoeba*

Date :	
Opérateur :	
Date dilution 1/10 amorces	

Confitions de PCR :	
Technique	Sybr green
Concentration finale amorce FOR 2	0,5 μ M
Concentration finale amorce REV	0,5 μ M
Concentration finale MgCl ₂	4mM
Température d'hybridation	68°C
Nombre de cycles	40
Quantité de mix	15 μ L
Quantité ADN	5 μ l
Automate utilisé	LC2
Programme utilisé	MACRO test Sybr
Canal de lecture	530

Conditions de mix	4mM		
	Volume pour 1 mix	Nombre de mix	Volume à pipeter
Mix Taq Sybr	2		
FOR2-REV (Solution mère au 1/10)	2		
MgCl ₂	2,4		
H ₂ O	8,6		
	15		

Bibliographie

1. Sizaret D, Brault A, Tabareau-Delalande F, Maître F (2015) Étude historique du microscope optique : Des premières lentilles du XVIIe siècle aux techniques de super-résolution et de lecture automatisée. *Revue Francophone des Laboratoires* 2015:67–79. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(15\)72789-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(15)72789-9)
2. Gros G (1849) *Fragments d'helminthologie et de physiologie microscopique*
3. R Acuna-Soto, Samuelson J (1993) Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 48:58–70
4. Dao AH, Robinson DP, Wong SW (1983) Frequency of *Entamoeba Gingivalis* in Human Gingival Scrapings. *Am J Clin Pathol* 80:380–383. <https://doi.org/10.1093/ajcp/80.3.380>
5. Bonner M, Fresno M, Gironès N, et al (2018) Reassessing the Role of *Entamoeba gingivalis* in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol* 8:379. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00379>
6. Brooke M (1940) Supernucleate cysts of *Endamoeba coli*. *Am J Epidemiol* 32:100–111
7. Lösch F (1875) Massenhafte Entwicklung von Amöben im Dickdarm. *Archiv f pathol Anat* 65:196–211. <https://doi.org/10.1007/BF02028799>
8. Ali IKM (2015) Intestinal amebae. *Clin Lab Med* 35:393–422. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.009>
9. Diamond LS, Clark CG (1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 40:340–344
10. (1997) Organisation mondiale de la santé ; Relevé épidémiologique hebdomadaire. <https://www.who.int/docstore/wer/pdf/1997/wer7214.pdf>. Accessed 5 Oct 2019
11. Burrows RB (1957) *Endamoeba hartmanni*. *Am J Epidemiol* 65:172–188. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119864>
12. Kessel JF, Johnstone HG (1949) The occurrence of *Endamoeba Polecki*, Prowazek 1912, in Macaca Mulatta and in man. *Am J Trop Med Hyg* s1-29:311–317. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1949.s1-29.311>
13. Burrows RB, Klink GE (1955) *Endamoeba polecki* infections in man. *Am J Epidemiol* 62:156–167. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119769>
14. Tshalaia L (1941) A species of *Entamoeba* detected in sewage. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* 10:244–252
15. Dreyer D (1961) Growth of a strain of *Entamoeba histolytica* at room temperature. *Tex Rep Biol Med* 19:393–396

16. Shimokawa C, Kabir M, Taniuchi M, et al (2012) *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *J Infect Dis* 206:744–751. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis414>
17. Royer TL, Gilchrist C, Kabir M, et al (2012) *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 18:1543–1545. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120122>
18. Fotedar R, Stark D, Beebe N, et al (2007) Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba Species*. *Clin Microbiol Rev* 20:511–532. <https://doi.org/10.1128/CMR.00004-07>
19. CDC (2019) Amebiasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>. Accessed 6 Oct 2019
20. Salit IE, Khairnar K, Gough K, Pillai DR (2009) A possible cluster of sexually transmitted *Entamoeba histolytica*: genetic analysis of a highly virulent strain. *Clin Infect Dis* 49:346–353. <https://doi.org/10.1086/600298>
21. NCBI Taxonomy *Entamoeba*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5758>. Accessed 6 Oct 2019
22. Stensvold CR, Lebbad M, Victory EL, et al (2011) Increased sampling reveals novel lineages of *Entamoeba* : consequences of genetic diversity and host specificity for taxonomy and molecular detection. *Protist* 162:525–541. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.11.002>
23. Jacob AS, Busby EJ, Levy AD, et al (2016) Expanding the *Entamoeba* Universe : New Hosts Yield Novel Ribosomal Lineages. *J Eukaryot Microbiol* 63:69–78. <https://doi.org/10.1111/jeu.12249>
24. Ximénez C, Morán P, Rojas L, et al (2009) Reassessment of the epidemiology of amebiasis : state of the art. *Infect Genet Evol* 9:1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008>
25. Stanley SL (2003) Amoebiasis. *The Lancet* 361:1025–1034. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)12830-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)12830-9)
26. Gathiram V, Jackson TF (1987) A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J* 72:669–672
27. Haque R, Ali IM, Sack RB, et al (2001) Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 183:1787–1793. <https://doi.org/10.1086/320740>
28. Collège des universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT) (2016) ePILLY trop-Maladies infectieuses tropicales, Alinéa Plus
29. Fotedar R, Stark D, Marriott D, et al (2008) *Entamoeba moshkovskii* infections in Sydney, Australia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:133–137. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0399-9>
30. Parija SC, Khairnar K (2005) *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar* associated infections in Pondicherry, India. *J Health Popul Nutr* 3:292–294

31. Yakoob J, Abbas Z, Beg MA, et al (2012) *Entamoeba species* associated with chronic diarrhoea in Pakistan. *Epidemiol Infect* 140:323–328. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000215>
32. Gilchrist CA (2014) *Entamoeba bangladeshi*: An insight. *Trop Parasitol* 4:96–98. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.138536>
33. Ngobeni R, Samie A, Moonah S, et al (2017) *Entamoeba Species* in South Africa : correlations with the host microbiome, parasite burdens, and first description of *Entamoeba bangladeshi* Outside of Asia. *J Infect Dis* 216:1592–1600. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix535>
34. Matsumura T, Hendarto J, Mizuno T, et al (2019) Possible pathogenicity of commensal *Entamoeba hartmanni* revealed by molecular screening of healthy school children in Indonesia. *Trop Med Health* 47:. <https://doi.org/10.1186/s41182-018-0132-7>
35. Graffeo R, Archibusacci CM, Soldini S, et al (2014) *Entamoeba dispar* : a rare case of enteritis in a patient living in a nonendemic area. *Case Rep Gastrointest Med* 2014:498058. <https://doi.org/10.1155/2014/498058>
36. Oliveira FMS, Neumann E, Gomes MA, Caliani MV (2015) *Entamoeba dispar* : Could it be pathogenic. *Trop Parasitol* 5:9–14. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.149887>
37. Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, et al (2012) Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol* 11:107–117
38. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie (ANOFEL) (2018) Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et pratiques diagnostiques, Elsevier-Masson
39. Stensvold CR, Winiecka-Krusnell J, Lier T, Lebbad M (2018) Evaluation of a PCR method for detection of *Entamoeba polecki*, with an overview of its molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* 56:. <https://doi.org/10.1128/JCM.00154-18>
40. Chihi A, Stensvold CR, Ben-Abda I, et al (2019) Development and evaluation of molecular tools for detecting and differentiating intestinal amoebae in healthy individuals. *Parasitology* 146:821–827. <https://doi.org/10.1017/S0031182018002196>
41. Saidin S, Othman N, Noordin R (2019) Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38:15–38. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3379-3>
42. Koskiniemi S, Granlund M, Forsell J, et al (2015) Evaluation of factors affecting real-time PCR performance for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical stool samples. *J Med Microbiol* 64:1053–1062. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000129>
43. Kebede A, Verweij JJ, Endeshaw T, et al (2004) The use of real-time PCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary-school children in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol* 98:43–48. <https://doi.org/10.1179/000349804225003082>
44. Pınar A, Akyön Y, Alp A, Ergüven S (2010) Adaptation of a sensitive DNA extraction method for detection of *Entamoeba histolytica* by real-time polymerase chain reaction. *Mikrobiyol Bul* 44:453–459

45. Cnops L, Esbroeck MV (2010) Freezing of stool samples improves real-time PCR detection of *Entamoeba dispar* and *Entamoeba histolytica*. J Microbiol Methods 80:310–312. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.001>
46. Tafforeau L (2015) Qu'en est-il de la biogenèse des ribosomes chez l'homme ? Med Sci (Paris) 31:622–628. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153106015>
47. Clark CG (2006) New insights into the phylogeny of *Entamoeba species* provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. Int J Syst Evol Microbiol 56:2235–2239. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.64208-0>
48. Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, 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*. PLoS One 14:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215068>
49. Santos HLC, Bandyopadhyay K, Bandea R, et al (2013) LUMINEX®: a new technology for the simultaneous identification of five *Entamoeba spp.* commonly found in human stools. Parasit Vectors 6:69. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-69>
50. Navidad JF, Griswold DJ, Gradus MS, Bhattacharyya S (2013) Evaluation of Luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance. J Clin Microbiol 51:3018–3024. <https://doi.org/10.1128/JCM.00896-13>
51. Liang S-Y, Chan Y-H, Hsia K-T, et al (2009) Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 47:1892–1895. <https://doi.org/10.1128/JCM.00105-09>
52. Leo M, Haque R, Kabir M, et al (2006) Evaluation of *Entamoeba histolytica* antigen and antibody point-of-care tests for the rapid diagnosis of amebiasis. J Clin Microbiol 44:4569–4571. <https://doi.org/10.1128/JCM.01979-06>
53. Parija S, Ponnambath D, Mandal J (2014) Laboratory methods of identification of *Entamoeba histolytica* and its differentiation from look-alike *Entamoeba spp.* Trop Parasitol 4:90. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.138535>
54. Blessmann J, Buss H, Nu PAT, et al (2002) Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Fecal Samples. J Clin Microbiol 40:4413–4417. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4413-4417.2002>
55. Haque R, Ali IM, Petri WA (1999) Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg 60:1031–1034. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.1031>
56. Al-Areeqi MA, Sady H, Al-Mekhlafi HM, et al (2017) First molecular epidemiology of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovskii* infections in Yemen : different species-specific associated risk factors. Trop Med Int Health 22:493–504. <https://doi.org/10.1111/tmi.12848>
57. Rivera WL, Santos SR, Kanbara H (2006) Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba histolytica* in an institution for the mentally retarded in the Philippines. Parasitol Res 98:106–110. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0024-8>

58. Nishise S, Fujishima T, Kobayashi S, et al (2010) Mass infection with *Entamoeba histolytica* in a Japanese institution for individuals with mental retardation: epidemiology and control measures. *Ann Trop Med Parasitol* 104:383–390. <https://doi.org/10.1179/136485910X12743554760388>
59. Peters CS, Sable R, Janda WM, et al (1986) Prevalence of enteric parasites in homosexual patients attending an outpatient clinic. *J Clin Microbiol* 24:684–685
60. Harkness J, Beebe N, Stark D, et al (2007) Prevalence of enteric protozoa in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and (HIV)-negative men who have sex with me from Sydney, Australia. *Am J Trop Med Hyg* 76:549–552. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.549>
61. Yanagawa Y, Nagata N, Watanabe K, et al (2016) Increases in *Entamoeba histolytica* antibody-positive rates in Human Immunodeficiency Virus–Infected and noninfected patients in Japan: A 10-Year Hospital-Based Study of 3,514 Patients. *Am J Trop Med Hyg* 95:604–609. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0134>
62. Gómez A, Ramiro M, Melendro EI, et al (2005) Infection by human immunodeficiency virus-1 is not a risk factor for amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 73:296–300. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.296>
63. (1985) Amoebiasis and its control. *Bull World Health Organ* 63:417–426
64. Ramiro M, Gómez A, Melendro EI, et al (2005) High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican communities. *Am J Trop Med Hyg* 73:87–91. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.87>
65. Ali IKM, Hossain MB, Roy S, et al (2003) *Entamoeba moshkovskii* infections in children in Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 9:580–584. <https://doi.org/10.3201/eid0905.020548>
66. López MC, León CM, Fonseca J, et al (2015) Molecular epidemiology of *Entamoeba* : first description of *Entamoeba moshkovskii* in a rural area from Central Colombia. *PLoS ONE* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140302>
67. Anuar TS, Al-Mekhlafi HM, Abdul Ghani MK, et al (2012) Molecular epidemiology of amoebiasis in Malaysia: highlighting the different risk factors of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections among Orang Asli communities. *Int J Parasitol* 42:1165–1175. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.003>
68. Bahrami F, Haghghi A, Zamini G, Khademerfan M (2019) Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in faecal samples using nested multiplex PCR in west of Iran. *Epidemiol Infect* 147:. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000141>
69. Beck DL, Dodan N, Maro V, et al (2008) High prevalence of *Entamoeba moshkovskii* in a Tanzanian HIV population. *Acta Trop* 107:48–49. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.03.013>
70. Ayed SB, Aoun K, Maamouri N, et al (2008) First molecular identification of *Entamoeba moshkovskii* in human stool samples in Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 79:706–707

71. Hamzah Z, Petmitr S, Mungthin M, et al (2006) Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J Clin Microbiol* 44:3196–3200. <https://doi.org/10.1128/JCM.00778-06>
72. Scaglia M, Villa M, Gatti S, et al (1982) *Entamoeba moshkovskii* : a new isolate from sewage sludges in Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76:703–704. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(82\)90248-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(82)90248-6)
73. Matey EJ, Tokoro M, Nagamoto T, et al (2016) Lower prevalence of *Entamoeba species* in children with vertically transmitted HIV infection in Western Kenya. *AIDS* 30:803–805. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001002>
74. Elsheikha HM, Regan CS, Clark CG (2018) Novel *Entamoeba* findings in Nonhuman Primates. *Trends Parasitol* 34:283–294. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.12.008>
75. Stensvold CR, Winiecka-Krusnell J, Lier T, Lebbad M (2018) Evaluation of a PCR method for detection of *Entamoeba polecki*, with an overview of its molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* 56:. <https://doi.org/10.1128/JCM.00154-18>
76. Verweij JJ, Polderman AM, Clark CG (2001) Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba Species*. *J Clin Microbiol* 39:1644–1646. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1644-1646.2001>
77. Foo PC, Chan YY, See Too WC, et al (2012) Development of a thermostabilized, one-step, nested, tetraplex PCR assay for simultaneous identification and differentiation of *Entamoeba species*, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from stool samples. *J Med Microbiol* 61:1219–1225. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.044552-0>
78. Hall BG (2013) Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* 30:1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
79. Silberman JD, Clark CG, Diamond LS, Sogin ML (1999) Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small- subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol* 16:1740–1751. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026086>
80. Clark CG, Diamond LS (1997) Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *J Eukaryot Microbiol* 44:142–154. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05951.x>
81. Bradbury R, Roy S, Ali IKM (2019) Case Report: Cervicovaginal co-colonization with *Entamoeba gingivalis* and *Entamoeba polecki* in association with an Intrauterine Device. *Am J Trop Med Hyg* 100:311–313
82. Clark CG, Diamond LS (1992) Colonization of the uterus by the oral protozoan *Entamoeba gingivalis*. *Am J Trop Med Hyg* 46:158–160. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.158>
83. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. (2017) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390:1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)

84. Demmer RT, Papapanou PN (2010) Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 53:28–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00326.x>
85. Eke PI, Wei L, Thornton-Evans GO, et al (2016) Risk indicators for periodontitis in US adults: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 87:1174–1185. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160013>
86. Bonner M, Amard V, Bar-Pinatel C, et al (2014) Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. *Parasite* 21:30. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014029>
87. Osman M, El Safadi D, Cian A, et al (2016) Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, Blastocystis and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004496>
88. Bilan tourisme en 2013. https://www.entreprises.gouv.fr/files/files/directions_services/etudes-et-statistiques/stats-tourisme/bilans/2014-11-Bilan-tourisme-2013.pdf. Accessed 29 Sep 2019
89. Institut National d’Etudes Démographiques (INED) - Flux d’immigration par sexe et âge en 2016 - France. <https://www.ined.fr/fr/tout-savoir-population/chiffres/france/flux-immigration/sexe-age/>. Accessed 29 Sep 2019
90. Calegar DA, Nunes BC, Monteiro KJL, et al (2016) Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111:114–119. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150383>
91. Nath J, Ghosh SK, Singha B, Paul J (2015) Molecular Epidemiology of Amoebiasis: A Cross-Sectional Study among North East Indian Population. *PLoS Negl Trop Dis* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004225>
92. Hung C-C, Ji D-D, Sun H-Y, et al (2008) Increased risk for *Entamoeba histolytica* infection and invasive amebiasis in HIV seropositive men who have sex with men in Taiwan. *PLoS Negl Trop Dis* 2:. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000175>
93. Stark D, van Hal SJ, Matthews G, et al (2008) Invasive amebiasis in men who have sex with men, Australia. *Emerg Infect Dis* 14:1141–1143. <https://doi.org/10.3201/eid1407.080017>
94. Timsit BL, Deroux A, Lugosi M, et al (2018) Amibiase : au cours de rapports sexuels, un mode de transmission sous-estimé? *Rev Med Interne* 39:586–588. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.04.004>
95. Billet AC, Salmon Rousseau A, Piroth L, Martins C (2019) An underestimated sexually transmitted infection: amoebiasis. *BMJ Case Rep* 12:. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-228942>
96. Fotedar R, Stark D, Beebe N, et al (2007) PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in Stool Samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* 45:1035–1037. <https://doi.org/10.1128/JCM.02144-06>

Serment de GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;
- De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Molecular detection of *Entamoeba species* in patients who had realised a parasitological stool examination at Toulouse University Hospital in 2018-2019 : Evaluation of prevalence and associated risk factors

Currently, few epidemiological studies have been conducted in Western Countries for the detection of digestive amoebae of the genus *Entamoeba*. The development of a PCR *Entamoeba sp.* for the detection of all 8 species described in humans (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. polecki*, *E. gingivalis*) has made it possible to evaluate the prevalence of patients infected with these parasites at Toulouse University Hospital between 2018 and 2019. A retrospective case-control study was then conducted to identify the risk factors associated with digestive detection of *Entamoeba*. From 957 patients who had parasitological examination of stool, the overall prevalence of digestive *Entamoeba* was 4,6%. Only *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. coli* et *E. gingivalis* were detected. The main risk factor identified is the recent return of an endemic area. *Entamoeba* positive patients are often co-infected with other intestinal protozoa. While the pathogenicity of *E. histolytica* is clearly identified in this study by the association with digestive signs and inflammatory reaction, the results obtained for *E. coli*, *E. hartmanni* et *E. dispar* corroborates the hypothesis that these species are non-pathogenic

Keys words : *Entamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba bangladeshi*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba gingivalis*, prevalence, PCR, molecular biology, sequencing

Détection moléculaire des espèces d'*Entamoeba* chez les patients ayant bénéficié d'un examen parasitologique des selles au CHU de Toulouse en 2018-2019 : Evaluation de la prévalence et des facteurs de risque associés

À l'heure actuelle, peu d'études épidémiologiques ont été réalisées dans les pays occidentaux sur la détection des amibes digestives du genre *Entamoeba*. Le développement d'une PCR *Entamoeba sp.* capable de détecter l'ensemble des 8 espèces retrouvées chez l'Homme (*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. polecki*, *E. gingivalis*) a permis d'évaluer la prévalence des patients infectés par ces parasites au CHU de Toulouse entre 2018 et 2019. Une étude rétrospective cas-témoin a ensuite été menée pour identifier les facteurs de risque associés à la détection digestive d'*Entamoeba*. À partir de 957 patients ayant bénéficié d'un examen parasitologique des selles, la prévalence globale des *Entamoeba* digestives était de 4,6%. Seules les espèces *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. coli* et *E. gingivalis* ont été détectées. Le facteur de risque principal identifié est le retour récent d'une zone d'endémie. Les patients positifs en *Entamoeba* sont souvent co-infectés avec d'autres protozoaires intestinaux. Alors que la pathogénicité d'*E. histolytica* est clairement identifiée dans cette étude par l'association avec des signes digestifs et d'une réaction inflammatoire, les résultats obtenus pour *E. coli*, *E. hartmanni* et *E. dispar* corroborent l'hypothèse que ces espèces sont non pathogènes.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : *Entamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba bangladeshi*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba gingivalis*, prévalence, PCR, biologie moléculaire, séquençage

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III Paul Sabatier – Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 chemin des Maraîchers – 31062 Toulouse Cedex9 – France
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie – Institut Fédératif de Biologie – CHU Toulouse, 330 avenue de Grande Bretagne – TSA40031 – 31059 Toulouse Cedex 9 - France

Directeur de thèse : Docteur IRIART Xavier