



UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE: **2020**

THESES **2020 /TOU3/2108**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

BENDJELLOUL Imane

**DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE PAN-
*SCHISTOSOMA***

Le 30 décembre 2020

Directeur de thèse : Professeur BERRY Antoine

JURY

Président : Monsieur le Professeur ALEXIS, Valentin

1er assesseur : Monsieur le Docteur IRIART, Xavier

2ème assesseur : Madame le Docteur GARNIER, Camille

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
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 BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUIMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	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. DELCOURT N.	Biochimie	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 ROUCH L.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERAEEVE 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 GADEA A.	Pharmacognosie
		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. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		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		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S	Biophysique		
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique		

SERMENT DE GALIEN

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

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) 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(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date

Signature de l'étudiant et du Président du jury

Version validée par la conférence des Doyens de facultés de Pharmacie le 7 février 2018

A mon papa, mon exemple...

Remerciements

A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN, je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Merci d'apporter votre expertise de parasitologue à ce travail et pour votre enseignement durant mon stage de parasitologie.

A Monsieur le Docteur Xavier IRIART, merci d'être là pour apporter tes connaissances. Merci pour ta gentillesse et ton enseignement au cours du stage de parasitologie-mycologie.

A Madame le Docteur Camille GARNIER, merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de nous faire profiter de votre avis en tant que clinicien.

A Monsieur le Professeur Antoine BERRY, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en me proposant ce sujet de thèse. Merci de m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail, merci pour les relectures, les conseils et le temps passé sur les séquences.

Aux techniciens de biologie moléculaire, Elodie, Alan, Julie et Valérie, sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Je ne vous remercierai jamais assez pour le temps consacré à mes manipulations de thèse.

A Monsieur le Professeur Jérôme BOISSIER, merci pour le matériel et votre aide dans ce projet.

A Muriel, merci encore pour tout ce que tu fais pour nous. Merci pour ta gentillesse.

Aux techniciens que j'ai pu rencontrer au cours de cet internat : Damien pour l'efficacité et le « tout à fait », merci pour ton humour, Chloé et sa discrétion, Karim et ses bons plats, à Jeni et son fort caractère, à Mélanie, à Laurent en bactério, et à tous les autres.

A ma famille,

A mes parents,

C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Vous m'avez toujours soutenu dans mes études et mes différents choix. Merci pour l'éducation que vous m'avez apporté. Je vous remercie d'avoir construit cette famille aussi fusionnelle. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, je vous en suis éternellement reconnaissante.

A ma mère,

A ton dynamisme et ta joie de vivre. Merci de faire en sorte que chaque moment de la vie soit agréable. Sache que je serai toujours là pour toi !

A mon papa,

A ces précieux souvenirs. A ces jours de concours où tu stressais autant que moi, à ce regard émerveillé lors de l'annonce des résultats, à toutes tes attentions, ta générosité, tes blagues qu'on ne comprenait pas, à nos vacances d'été. Ton comportement est pour moi un exemple à suivre. En ce jour particulier, j'ai une énorme pensée pour toi.

A mes frères et ma sœur

Je suis tellement fière de vous. A nos éternelles discussions autour des repas, à ces imitations et à cette facilité à rire dans toutes les circonstances. Merci d'avoir toujours été là et de trouver les bons mots pour me reconforter. Même si je suis l'aînée, je vous admire pour votre capacité à relativiser et à traverser certaines épreuves. A ce lien fraternel qui perdurera.

A ma cousine Myriam,

Merci pour ta gentillesse et ta présence. A ces vacances « en Provence » à Mont-De-Marsan, à tes expressions parisiennes, à ces soirées devant Prison Break. Nassim, prends soin d'elle.

A mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins,

Malgré la distance, merci d'être là et de me soutenir. Hâte de vous revoir !

A la famille Bessa Dias, merci de m'avoir agréablement accueillie.

A Laetitia et Diogo, merci d'avoir été présents ce jour-là. Aux prochains moments qu'on aura l'occasion de partager. A votre si belle famille fondée.

A mes copines de Bordeaux,

A Estelle, à qui je donne le trophée de la fille encore plus tête en l'air que moi, bravo ! A ma première rencontre de la fac de pharma, merci de me faire rire malgré toi. A tes oublis, à ta maladresse mais aussi à ta détermination. Tu seras une très bonne maman.

A Charlotte, la motivation incarnée. Merci pour tous ces fous rires et le soutien durant les cours de pharma. Merci d'être là pour tout organiser à chaque fois. Déçue que tu n'aies pas choisi Toulouse !

A Laetitia, à notre mauvaise perdante du groupe. Quoi de mieux que de t'avoir dans mon équipe, je sais au moins que je vais pouvoir gagner ! A ce voyage à Malte, à tes gourmandises, à ces repas italiens, à ces petites soirées chez toi, à ta fainéantise, à ta culture démesurée et vive Koh-Lanta !

A Marie, merci pour cette amitié. A ce concours et à ces excellents repas.

A Mathilde Larrivière, mon amie de longue date. Je suis contente de te retrouver depuis la pharma. Je te remercie pour tes conseils et ta bonne humeur. A nos prochaines soirées !

A Lulu, mon amie idéale. Merci de m'avoir épaulé durant toutes ces études. Tu sais pertinemment que je ne serai jamais arrivé jusque-là sans toi. A ces journées de galère à la BU, à nos café noisette, à nos voyages à l'autre bout du monde, à ce road-trip en Ecosse (Souviens-toi du drone), à ta folie et à tous ces fous rires. Je compte sur toi pour me donner des cours d'Ukulélé.

A mes belles rencontres toulousaines, merci pour cette belle amitié.

A Laure, à ta gentillesse, à ce sourire toujours présent, à toutes ces photos que tu nous partages si bien, à ta folie et à tes danses du genou. Merci de mettre le feu à nos soirées. Merci de prendre du plaisir à organiser nos week-ends si agréables et d'être aussi attentionnée.

A Aude, le sosie de Louane ou le bébé du groupe, derrière ce rire bruyant se cache une personne attachante. A ces discussions téléphoniques sur l'avenir et le sens de la vie. A ton incroyable talent à débiter un maximum de mots en 1minute. A ces cours de sport à la salle. Merci d'être toujours là.

A Sophie, je n'ai jamais rencontré une personne aussi bienveillante ! Je te remercie d'avoir été là, de trouver les bons mots à chaque fois, à ton optimisme et à ta vision positive de

toutes les situations. A ces confidences et à ces repas à l'appartement les veilles du DU. Hâte d'être en septembre !

A Emeline, ma première rencontre de l'internat. Merci pour ce semestre de bactériologie, je te tiens entièrement responsable de mes rires ! Même si tu n'es pas très forte pour épauler, (comme tu dis), je te remercie d'avoir toujours été là. A toutes ces soirées à l'internat, à tous tes bons plans et à ton côté révolutionnaire.

A Camille, mon meilleur binôme. A ton énergie débordante. A nos petits diners chez toi tout en écoutant Loulou jouer de la guitare. A ces conversations de filles et à ces pauses café. Merci pour cette amitié.

Aux Pouloulou, Ali, Hugo, Samuel et Charlotte, à votre humour et votre bonne compagnie, merci pour le fromage, la chèvre et la banane.

A Ali, je sais que je peux toujours compter sur toi (et ça dès les premiers instants à l'internat), à ta folie, à celui qui crie « Bendjelloul » à chaque fois qu'il me voit. A ce regard étonné dans les escaliers (toi-même tu sais...).

Aux internes,

A Maximin, le comique des soirées et le plus perché, à Hugo et son affection pour les pâtes, à Anaïs (la dépêche), à Théo et l'AS Roma (à tes qualités de grand chanteur), à Marine (pour son poney et ses chorégraphies), à Orancie l'aveyronnaise (merci pour ce semestre d'hémato, à ton soutien, à ce manque de confiance en soi haha), à Pilu (une agréable rencontre, merci pour ta gentillesse et ton humour déplacé, ne t'inquiète pas un jour tu seras ultra musclé), à Dorian et son éternelle patience, à Caroline et ses expressions de marseillaise, à Alban et son élégance, à Florence Micas (aux potins, on ne s'ennuie jamais avec toi), à Delphin et ses amnésies (et à ta gentillesse), à Eulalie et caroline (à ces moments dans le bureau de biochimie), à Marie Caucat et sa douceur, à Julia Depape et ses punchlines, à Pauline Condom (notre bouffée d'oxygène en hémato), à Laurie et sa passion pour les pizzas, à Lucie, à Apolline et à Mathilde (cafewwww, merci d'être aussi agréable), à Julien Bonnetot et son côté borné.

A Paul, à ton humour et à ta naïveté. A tes muscles qui s'atrophient ! Notre bonne entente était assez prévisible. Merci pour ta compagnie et ton naturel !

A Emilie Guemas, merci pour tes conseils et merci d'avoir été là dans ces moments difficiles. A cette vie à l'internat et à tes danses endiablées.

A mon semestre de bactério inoubliable,

A Karen et son côté parfois grincheux, à Thibault et ses enseignements de professeur, A Momoo et ses airs de grande dame (merci de nous avoir fait rire), à Isa et sa douceur et ses compétences en karaté, à Marion et sa motivation pour les soirées et à « Rapoutine », à Claudia et sa tranquillité, à Pauline Floch et à Clémence.

A Barni et Claire, j'ai passé un excellent semestre dans le Lot, ce fut un plaisir de travailler avec vous ! Barni, merci pour ta patience et ta gentillesse.

A Cahors, à nos brunchs, nos films, nos critiques devant les émissions de télé-réalité me manquent ! A ces soirées à écouter les meilleures chansons du moment haha, à nos séances de sport collectives.

A Sabine alias Wesh et son admiration pour Jul, à Apo, son fort caractère et sa sensibilité, à Jujuuu, le plus fort à tous les jeux, Franck et ses qualités de coach sportif, à Lucas et ses incontournables playlists, à Réjane et ses excellentes pâtisseries, à Anneeee (où es-tu Anneeee ?), à Benjamin le président, à Aurélie et sa bonne humeur, à Etienne et ses tee-shirt déchirés, à Sabrina et sa folie, à Chloé et sa gentillesse.

A Julia tout particulièrement, à ton côté frontal, merci d'être là. Tu m'as apporté tout le réconfort dont j'avais besoin. J'ai rarement rencontré une personne aussi énergique et sensible à la fois.

A David, merci de partager mon quotidien et de me supporter. J'ai hâte de découvrir la suite à tes côtés.

Sommaire

Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	16
Introduction.....	17
Partie I : Généralités.....	19
I. Histoire et taxonomie.....	19
II. Epidémiologie.....	22
1) Répartition mondiale.....	22
2) Foyer autochtone en Corse.....	27
III. Cycle du parasite.....	30
1) Cycle asexué.....	30
2) Cycle sexué.....	30
IV. Physiopathologie et aspects cliniques.....	32
1) Phase de pénétration.....	32
2) Phase d'invasion (ou aigüe).....	32
3) Phase d'état et de complications (ou chronique).....	32
V. Traitements.....	35
VI. Prévention.....	37
Partie II : Diagnostic biologique.....	41
I. Diagnostic non spécifique.....	42
II. Diagnostic spécifique.....	42
1) Microscopie.....	42
2) Techniques immunologiques.....	43
3) Techniques moléculaires.....	47
Partie III : Développement d'un outil de diagnostic moléculaire pan- <i>Schistosoma</i>	55
I. Objectif.....	55
II. Matériel et méthodes.....	56
1) Design de la PCR Pan- <i>Schistosoma</i>	56
2) Validation et application de la PCR <i>pan-Schistosoma</i>	57
3) Séquençage.....	62
III. Résultats.....	65

1) Mise en place de la PCR pan- <i>Schistosoma</i>	65
2) Validation de la PCR pan- <i>Schistosoma</i>	68
3) Identification des amplicons par séquençage	72
4) Applications des méthodes de détection moléculaire pan- <i>Schistosoma</i>	78
IV. Discussion	81
Conclusion et perspectives.....	83
ANNEXES.....	84
Bibliographie	97

Liste des figures

Figure 1 : Taxonomie des schistosomes (6).....	19
Figure 2 : Des années de découverte de la schistosomose (7)	20
Figure 3 : Phylogénie des espèces de schistosomes grâce à l'étude de l'ADNr et ADN mitochondrial (8).....	21
Figure 4: Répartition mondiale de la schistosomose (10).....	22
Figure 5 : Prévalence de la schistosomose en fonction de l'âge dans une zone à risque modéré (9)	23
Figure 6 : Morbidité et mortalité due à <i>S. haematobium</i> et <i>S. mansoni</i> en Afrique Subsaharienne (Données OMS 2000) (1)	24
Figure 7 : Répartition mondiale des espèces de <i>Schistosoma</i> (17)	25
Figure 8: Régions à l'origine d'infections chez un patient type (<i>Non européens : immigrants, Expatriés : Européens vivant en zone d'endémie, Européens : touristes visitant une zone d'endémie</i>) (11)	26
Figure 9: Différents sites en Corse (1,2,3,5 et 6) de rencontre du <i>Bulinus truncatus</i> (29).....	28
Figure 10: Phylogénétique de <i>S. bovis</i> de Corse et d'Afrique par COX1 (14)	29
Figure 11 : Cycle de vie du parasite <i>Schistosoma</i> sp. (CDC) (30).....	31
Figure 12 : Angiooedème à type d'urticaire en phase d'invasion (1).....	32
Figure 13: Manifestations cliniques lors de la phase d'état (41)	34
Figure 14: Structure chimique du praziquantel (44)	35
Figure 15: Proportion de pays mettant en œuvre la chimioprévention de la schistosomose de 2006 à 2020 (51)	38
Figure 16: Population cible recevant une chimioprévention dans le contrôle de la schistosomose (10).....	39
Figure 17: Nombre de personnes ayant reçu une chimioprévention contre la schistosomose dans le monde entier de 2012 à 2018 (OMS 2019) (59)	40
Figure 18: Morphologie des œufs spécifiques d'espèce au microscope (31)	43
Figure 19: Titrage d'un sérum positif par IHA (Notice)	45
Figure 20: Exemple de profils rencontrés par Western blot (zone entre 8 et 34kDa)	46
Figure 21 : Principe d'une PCR avec sonde TaqMan (76).....	48
Figure 22: Schéma représentatif des génomes mitochondriaux de <i>S. spindale</i> et <i>S. haematobium</i> (98).....	51
Figure 23: Opéron du gène ARN ribosomique chez les eucaryotes (99).....	51
Figure 24 : Cinétique du taux d'échantillons positifs dans le sérum par PCR, ELISA et HA après traitement (5) .	54
Figure 25 : Principe du séquençage (Institut d'Optique Paristech).....	63
Figure 26: Exemple d'alignement partiel du génome mitochondrial complet de <i>S. haematobium</i> et <i>S. mansoni</i>	65
Figure 27 : Exemple d'alignement partiel du génome mitochondrial complet de <i>S. japonicum</i> et <i>S. mekongi</i> ...	66
Figure 28 : Design PCR pour amplifier la cible ITS 2 (<i>violet : amorce sens, rose : sonde, jaune : amorce anti-sens</i>)	66
Figure 29 : Alignement partiel des séquences ITS de toutes les espèces de <i>Schistosoma</i> avec amorces et sonde	68
Figure 30 : Courbes d'amplification obtenues avec la PCR pan- <i>Schistosoma</i> (espèces africaines) avec en abscisse le nombre de cycles et en ordonnées la fluorescence mesurée	69
Figure 31: Courbes d'amplification obtenues avec la PCR pan- <i>Schistosoma</i> (espèces asiatiques).....	69
Figure 32 : Corrélation entre les Ct de la PCR pan et de la PCR spécifique <i>Sh</i>	71
Figure 33: Corrélation entre les Ct de la PCR pan et de la PCR spécifique <i>Sm</i>	72
Figure 34: Alignement des séquences pour le design des amorces du séquençage.....	74
Figure 35 : Electrophorèse capillaire des fragments à séquencer	75
Figure 36 : Exemple de chromatogramme - brin sens de l'espèce <i>Sh</i> (Chromas®)	76
Figure 37 : Exemple de chromatogramme - brins anti-sens <i>Sh</i> (Chromas®)	76
Figure 38 : Alignement des 2 brins et résultat de la séquence complète du fragment amplifié	76
Figure 39 : Comparaison à la banque de données GenBank®	76

Figure 40 : Alignement des séquences et les différences nucléotidiques entre espèces	78
Figure 41: Chromatogramme d'une partie de séquence du brins sens - présence de mutations hétérozygotes	80

Liste des tableaux

Tableau 1: Résumé de la répartition géographique de chaque espèce (1).....	26
Tableau 2 : Surveillance post-thérapeutique (47).....	36
Tableau 3 : Statut des pays d'endémie de schistosomose dans les régions de l'OMS (51)	38
Tableau 4 : Séquences des amorces et des sondes spécifiques de <i>Sm</i> et <i>Sh</i>	60
Tableau 5 : Exemple de composition du mélange réactionnel PCR pan- <i>Schistosoma</i>	61
Tableau 6: Résultats de la PCR pan- <i>Schistosoma</i> et PCR de routine <i>Sm</i> et <i>Sh</i> des souches d'espèce connue (<i>ND</i> : non détectable, <i>NF</i> : non fait).....	70
Tableau 7: Nombre de cycles de PCR obtenus avec la PCR pan- <i>Schistosoma</i> pour les échantillons positifs en PCR en temps réel <i>Sh</i> ou <i>Sm</i> spécifique	79

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CCA : Antigène Circulant Cathodique

CAA : Antigène Circulant Anodique

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

COX1 : Cyclooxygénase 1

CP: Chimiothérapie préventive

dNTPs : désoxynucléotides triphosphates

ddNTPs : didésoxyribonucléotides

EIA : Enzyme Immuno Assay

ELISA : Enzyme Linked-Immunosorbant Assay

HAS: Haute Autorité de Santé

HCSP : Haut Conseil de la Santé Publique

HD: Hôte Définitif

HI : Hôte intermédiaire

HAI : Test d'Inhibition de l'Hémagglutination

IFA : Immunofluorescence assay

ITS : Internally transcribed Spacer

Ig: Immunoglobuline

LAMP : Loop-Mediated Isothermal Amplification

LTR : Long Terminal Repeat

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pb : paires de bases

S.h: Schistosoma haematobium

S.m: Schistosoma mansoni

S.j : Schistosoma japonicum

S.k: Schistosoma mekongi

WB : Western Blot

Introduction

La schistosomose est une pathologie tropicale négligée (1), due à un plathelminthe de la classe des trématodes et du genre *Schistosoma*, parasite des plexus veineux abdominaux (2).

Source majeure de morbidité et de mortalité, cette parasitose est une priorité de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). En 2018, on estimait que 229 millions de personnes avaient besoin d'un traitement préventif contre la schistosomose. Plus de 90% des infections se produisent en Afrique (1). Deuxième endémie mondiale parasitaire après le paludisme, elle est en France l'une des principales parasitoses d'importation. Depuis 2013, un foyer autochtone de schistosomose urogénitale causée par un hybride de *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* émerge en Corse, localisé dans la rivière « Cavu » (3). Une extension à une rivière voisine « la Solenzara » semble se confirmer.

Les principales espèces pathogènes pour l'homme sont *Schistosoma haematobium* responsable d'une forme urogénitale, *Schistosoma mansoni* agent de la schistosomose hépato-intestinale, *Schistosoma japonicum* et *Schistosoma mekongi* à l'origine d'une schistosomose hépato-intestinale rapidement sévère (4).

L'Homme s'infecte lors d'une baignade en eau douce par pénétration transcutanée des larves libérées par les mollusques aquatiques. La schistosomose peut être pauci-symptomatique ou prendre la forme d'une infection chronique avec l'apparition de lésions irréversibles fibrotiques pouvant évoluer vers un cancer vésical pour la forme urogénitale.

Le diagnostic clinique peut être difficile en raison de symptômes peu spécifiques. Les examens de biologie présentent un grand intérêt. Actuellement, le diagnostic de la schistosomose est posé sur la mise en évidence des œufs dans les selles ou les urines par examen microscopique. Cette technique présente une faible sensibilité et devrait être prochainement abandonnée au profit des techniques de biologie moléculaire connues pour leur bonne spécificité et sensibilité. Une PCR en temps réel détectant les 2 principales espèces *S. haematobium* et *S. mansoni* dans les urines, les selles, le sérum et les biopsies s'effectue en routine au CHU de Toulouse (5). Toutefois, il est possible de passer à côté du diagnostic de schistosomoses contractées par les espèces asiatiques.

En raison de la disparition de l'examen microscopique, il est nécessaire de mettre en place une PCR pan-*Schistosoma* détectant toutes les espèces pathogènes pour l'Homme.

Dans cette étude, les généralités et les techniques de diagnostic biologique de la schistosomose seront présentées dans un premier temps (Parties I et II). Ensuite, nous développerons la mise en place et l'évaluation des performances de la PCR et du séquençage assurant le diagnostic de toutes les espèces pouvant infecter l'Homme (Partie III).

Partie I : Généralités

I. Histoire et taxonomie

Les schistosomes font partie de l'embranchement des vers plats ou plathelminthes non segmentés , à sexes séparés et hémato-phages , de la classe Trematoda et de la famille Schistosomatidae (Figure 1) (6).

Kingdom:	<i>Animalia</i>
Phylum:	<i>Platyhelminthes</i> (Flatworms)
Class:	<i>Trematoda</i> (Flukes)
Subclass:	<i>Digenea</i>
Order:	<i>Strigeida</i>
Family:	<i>Schistosomatidae</i>
Subfamily:	<i>Schistosomatinae</i>
Genus:	<i>Schistosoma</i>
Species:	<i>S. mansoni</i> group <i>S. japonicum</i> group <i>S. haematobium</i> group <i>S. indicum</i> group

Figure 1 : Taxonomie des schistosomes (6)

Le parasite *Schistosoma* est décrit chez l'homme par le médecin Théodor Bilharz en 1851 (7). La schistosomose est une maladie ancienne : elle est évoquée dans les papyrus égyptiens et des œufs calcifiés ont été retrouvés dans des momies égyptiennes datant de -1200 avant JC. Il aura fallu quelques années pour comprendre le cycle de *Schistosoma*, l'existence de divers hôtes définitifs et intermédiaires, la distinction entre les espèces. Cette pathologie se répand parallèlement à l'évolution de l'homme et aux flux migratoires (Figure 2) (7).

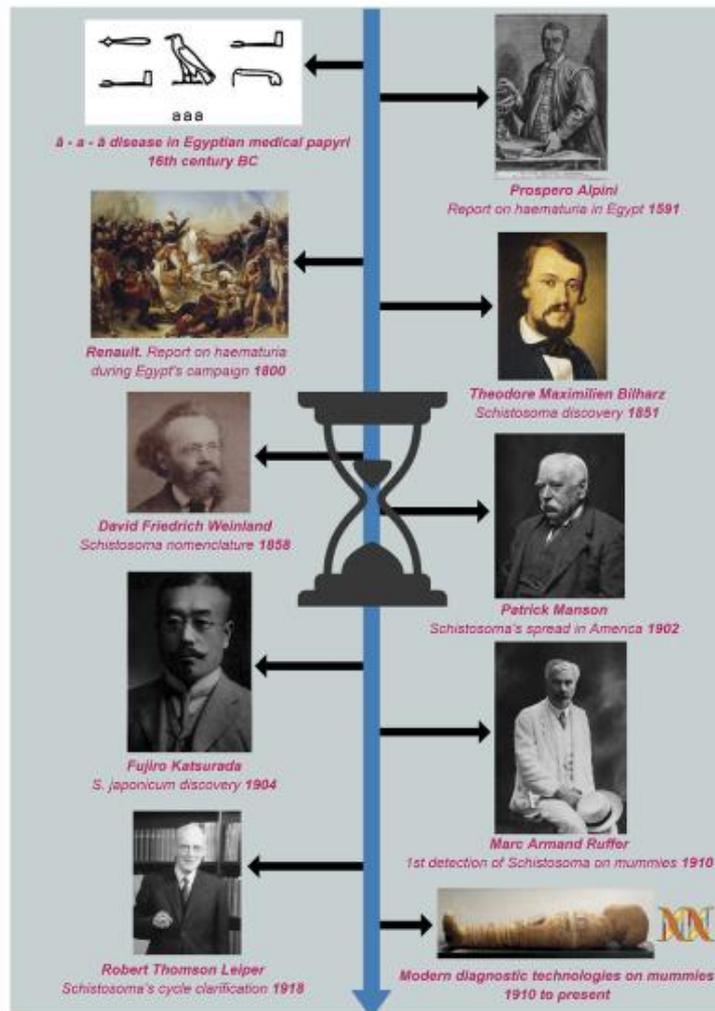


Figure 2 : Des années de découverte de la schistosomose (7)

Une étude phylogénétique a décrit les relations entre les espèces de schistosomes par analyse de l'ARN ribosomique et l'ADN mitochondrial. Cet arbre démontre la grande diversité et l'origine asiatique des espèces de schistosomes. On distingue 4 groupes principaux correspondants aux différentes distributions géographiques du parasite : *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* et *S. indicum*. Certaines espèces sont plutôt retrouvées en région asiatique (*S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. malayensis*) et d'autres en région africaine (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. guineensis*, *S. bovis*, *S. intercalatum*) (Figure 3) (8).

Vingt-et-une espèces du genre *Schistosoma* sont décrites dont 5 espèces principales pathogènes pour l'Homme : *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* et *S. intercalatum*.

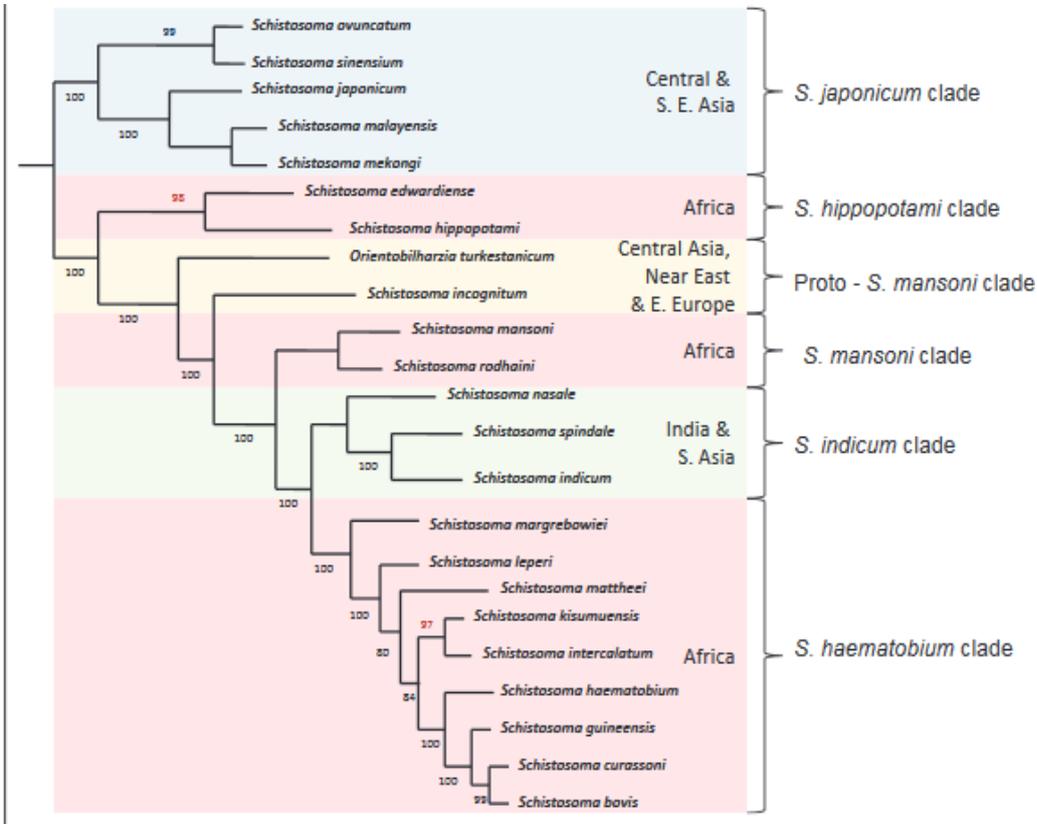


Figure 3 : Phylogénie des espèces de schistosomes grâce à l'étude de l'ADNr et ADN mitochondrial (8)

II. Epidémiologie

1) Répartition mondiale

La schistosomose est la 2^{ème} infection parasitaire la plus répandue dans le monde après le paludisme. Il est estimé que plus de 200 millions d'individus sont atteints dans le monde, majoritairement en Afrique sub-saharienne (93%)(9) (Figure 4).

Huit cent millions sont exposés au risque d'infection à *Schistosoma*. En effet, la transmission de la schistosomose est retrouvée dans 78 pays différents (1,9,10). Cette disparité est due à la répartition des hôtes intermédiaires spécifiques, aux conditions climatiques (température estivale, eau douce), aux conditions sanitaires (défaut d'assainissement) et au contexte socio-économique. L'endémicité évolue constamment en fonction des modifications de l'environnement, des programmes de développement hydrique, des migrations et des programmes de lutte contre la parasitose (1).

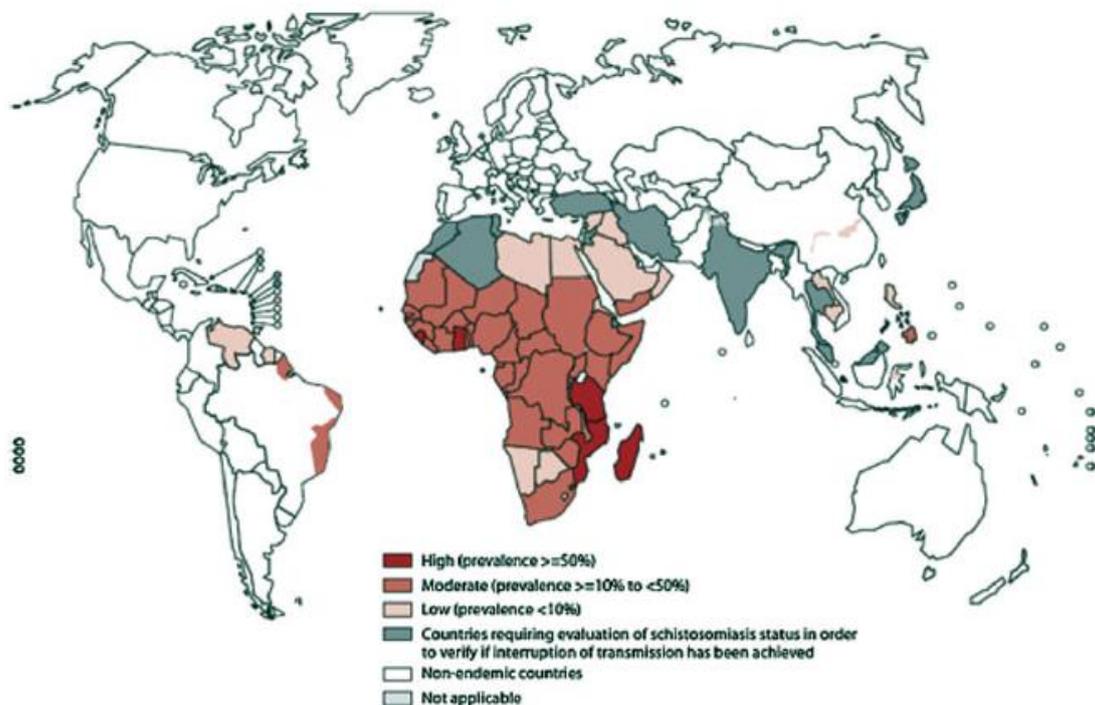
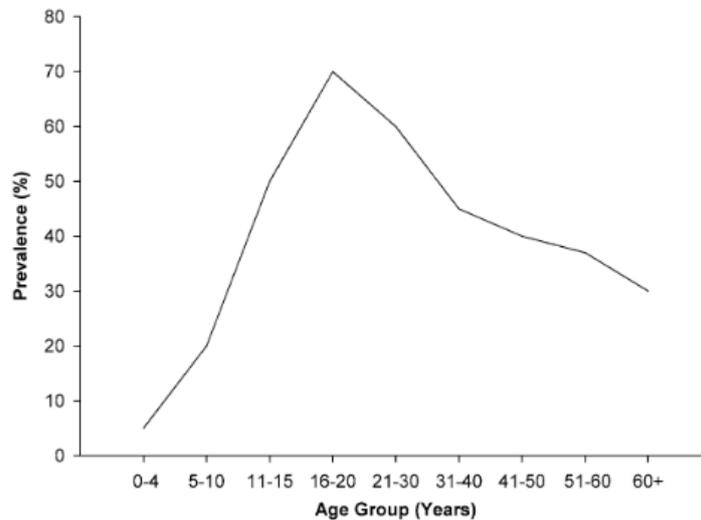


Figure 4: Répartition mondiale de la schistosomose (10)

La prévalence est plus importante chez les enfants scolarisés et les jeunes adultes. Puis, le nombre de cas a tendance à diminuer progressivement avec l'âge (9) (Figure 5).



[Figure 5](#) : Prévalence de la schistosomose en fonction de l'âge dans une zone à risque modéré (9)

La prévalence est sous-estimée dans certains pays à cause des formes asymptomatiques. Néanmoins, 120 millions des personnes infectées sont symptomatiques et 20 millions présentent des complications sévères (11).

En Afrique sub-saharienne, la morbidité de la schistosomose est conséquente et majoritairement attribuée à *S. haematobium* (112 millions cas infectés), suivie de *S. mansoni* (54 millions de cas infectés), ce qui place cette maladie comme problème de santé publique (figure 6) (12).

Schistosome species	Estimated morbidity and mortality (millions) ^b
<i>S. haematobium</i>	
At risk of infection	436
Infected	112
Haematuria during previous 2 weeks	71 (52-89)
Dysuria during previous 2 weeks	32 (17-55)
Minor bladder morbidity (detected by ultrasound)	76 (67-92)
Major bladder morbidity (detected by ultrasound)	24 (15-31)
Moderate hydronephrosis	9.6
Major hydronephrosis	9.6
Non-functioning kidney	[1.7]
Non-functioning kidney (deaths/year)	[0.15]
Bladder cancer (deaths/year)	
Males	[0.011]
Females	[0.0023]
<i>S. mansoni</i>	
At risk of infection	393
Infected	54
Diarrhoea during previous 2 weeks	0.78 (0.0-7.8)
Blood in stool during previous 2 weeks	4.4 (3.0-8.3)
Hepatomegaly (mid-sternal line)	8.5
Splenomegaly	[6.3]
Ascites	[0.29]
Haematemesis (ever)	[0.93]
Haematemesis (deaths/year)	[0.13]

^a Source reference 5 and M.J. Vander Werf & S.J. De Vlas (personal communication).
^b 90% confidence interval in parentheses.

Figure 6 : Morbidité et mortalité due à *S. haematobium* et *S. mansoni* en Afrique Subsaharienne (Données OMS 2000) (1)

Malgré la mise en place de méthodes de prévention et de lutte depuis 2000, la schistosomose est loin d'être maîtrisée dans le monde avec une estimation de la mortalité de 20 000 à 200 000 personnes par an (1), dont 150 000 sont causées par *S. haematobium* (12).

Endémique dans les régions subsahariennes et asiatiques, la schistosomose siège principalement dans les zones rurales, notamment dans les communes démunies d'accès à de l'eau salubre et à un assainissement satisfaisant (Figure 7). L'homme s'infecte continuellement par contact avec l'eau douce contaminée. Chez l'enfant, cette contamination a lieu lors de baignades à risque et chez l'adulte lors des activités agricoles, professionnelles ou domestiques (notamment lavage de linge ou occupations récréatives courantes) (13). Il n'existe pas de transmission interhumaine ni de transmission materno-foetale du parasite.

Schistosoma haematobium est retrouvé principalement en Afrique intertropicale, sur la côte Ouest de Madagascar, les vallées du Nil et plus rarement au Moyen Orient et dans la rivière Cavu en Corse. Il n'est pas retrouvé sur le continent Américain.

L'atteinte génitale chez la femme, par la schistosomose urogénitale, est estimée à environ 16 millions de personnes. Il s'agit d'un facteur de risque d'infertilité et d'infections sexuellement transmissibles, notamment d'infection par le VIH (14–16).

Schistosoma mansoni est présent majoritairement en Afrique intertropicale, dans le delta du Nil, la côte Est de Madagascar, le Venezuela, le Suriname et le Brésil. La schistosomose intestinale est absente du territoire français. En effet, la transmission de *S. mansoni* a disparu des Antilles françaises depuis les années 1980.

Schistosoma japonicum est retrouvé principalement en Chine (limitée au bassin du Yang Tsé Klang), en Indonésie (foyers limités sur l'île de Sulawesi) et aux Philippines.

Schistosoma mekongi est présent au Cambodge et dans la république démocratique du Laos. *Schistosoma intercalatum* et *S. guineensis* sont retrouvés dans les zones forestières humides d'Afrique Centrale et sur l'île de Saotome et Principe (17) (Tableau 1).

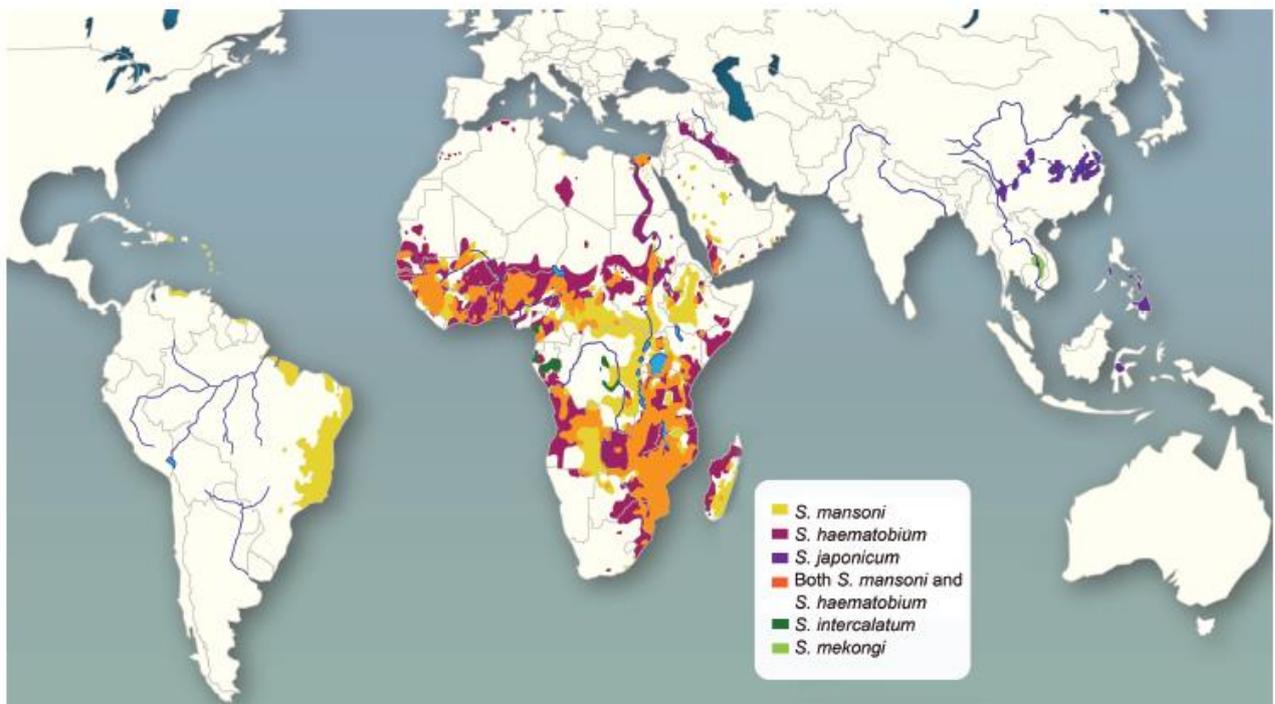


Figure 7 : Répartition mondiale des espèces de *Schistosoma* (17)

Tableau 1: Résumé de la répartition géographique de chaque espèce (1)

	Espèces parasitaires	Répartition géographique
Schistosomose intestinale	<i>Schistosoma mansoni</i>	Afrique , Moyen-Orient, Brésil, Venezuela, Suriname
	<i>S. intercalatum</i> et <i>S. guineensis</i>	Zone des forêts tropicales humides en Afrique centrale
	<i>S. mekongi</i>	Cambodge, Laos
	<i>S. japonicum</i>	Chine, Indonésie, Philippines
Schistosomose urogénitale	<i>S. haematobium</i>	Afrique , Moyen-Orient, Corse

Dans les régions non endémiques, la maladie est retrouvée chez les voyageurs ou migrants qui s'infectent dans des zones de forte prévalence par contact avec l'eau douce (18–20).

Le réseau européen de médecine tropicale et de santé des voyageurs (European Network for Tropical Medicine and Travel Health) a mené une étude sur 1465 cas importés de schistosomose entre 1997 et 2010. Parmi eux, 33 % étaient des voyageurs européens, 16% des expatriés et la majorité, des migrants non européens (51%) (11). La plupart des voyageurs et migrants malades étaient principalement de retour d'Afrique (95% des cas), plus rarement d'Amérique du Sud (1,4%) et d'Asie du Sud (1,4%) (11) (Figure 8).

Region of infection	Region of infection by patient type			
	Total	European	Expatriate	Non-European
Africa, not further definition	15 (1%)	9 (0.6%)	4 (0.3%)	2 (0.1%)
Africa, Central	245 (16.7%)	21 (1.4%)	92 (6.3%)	132 (9%)
Africa, East	490 (33.4%)	261 (17.8%)	82 (5.6%)	147 (10%)
Africa, Northern	59 (4%)	10 (0.7%)	1 (< 0.1%)	48 (3.3%)
Africa, Southern	15 (1%)	9 (0.6%)	5 (0.3%)	1 (< 0.1%)
Africa, Western	581 (40%)	144 (10%)	41 (3%)	396 (27%)
America, Central*	2 (0.1%)	2 (0.1%)	0	0
America, South	21 (1.4%)	8 (0.6%)	1 (< 0.1%)	12 (0.8%)
Asia, East	2 (0.1%)	1 (< 0.1%)	1 (< 0.1%)	0
Asia, South	4 (0.2%)	2 (0.1%)	0	2 (0.1%)
Asia, Southeast	21 (1.4%)	13 (0.9%)	3 (0.2%)	5 (0.3%)
Asia, West	7 (0.5%)	3 (0.2%)	1 (< 0.1%)	3 (0.2%)
Caribbean	2 (0.1%)	2 (0.1%)	0	0
Unknown	1 (< 0.1%)	1 (< 0.1%)	0	0

* Information as given by travellers. Since Schistosomiasis is not endemic in Central America, the infection may have been acquired in other countries visited before.

Figure 8: Régions à l'origine d'infections chez un patient type (Non européens : immigrants, Expatriés : Européens vivant en zone d'endémie, Européens : touristes visitant une zone d'endémie) (11)

En France, il s'agit principalement d'une pathologie d'importation. Plus de 2000 cas sont diagnostiqués chaque année (21).

L'accroissement du tourisme, l'exode rural et les migrations des réfugiés favorisent l'augmentation de diagnostic de schistosomose et l'émergence de nouvelles aires géographiques de transmission (11).

2) Foyer autochtone en Corse

L'émergence des maladies infectieuses tropicales en Europe est rare. Des cas de transmission autochtone de maladies vectorielles (dengue, chikungunya et paludisme) ont été signalés ponctuellement au sud de l'Europe.

Le Portugal avait décrit un foyer de transmission de schistosomose urogénitale de 1920 à 1967, mettant en cause une importation du parasite de l'Angola (21,22).

En 2013, un foyer autochtone de schistosomose urogénitale est mis en évidence en Corse. En 2014, le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) a programmé le dépistage par sérologie de toutes les personnes ayant été en contact avec la rivière Cavu (en Corse du Sud) entre 2011 et 2013, ainsi que des investigations sur les lieux de contamination et des mesures pour interrompre le cycle de transmission. La schistosomose autochtone devient, dès lors, une maladie à déclaration obligatoire. Trente-sept mille dépistages ont été effectués en Corse. Cent six cas ont été diagnostiqués, dont 66% de patients asymptomatiques (23–26). Tous les patients avec une sérologie positive ont reçu un traitement par Biltricide® (27).

Grâce aux avancées de la biologie moléculaire, l'espèce en cause a pu être identifiée et serait un hybride de *S. bovis* et de *S. haematobium* (14).

L'émergence de la schistosomose en Corse peut s'expliquer par plusieurs phénomènes:

- la présence de l'hôte intermédiaire de *Schistosoma bovis*, *Bulinus truncatus*, documenté en 1962 en Corse et pouvant héberger cette forme hybride (21,28)(Figure 9)
- l'accroissement du tourisme et donc une probable importation du parasite (22)
- les changements environnementaux et particulièrement, l'augmentation de la température des eaux douces (3,24)

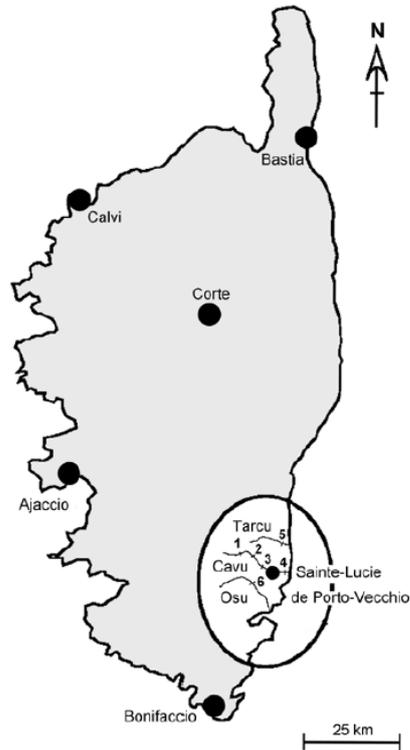


Figure 9: Différents sites en Corse (1,2,3,5 et 6) de rencontre du *Bulinus truncatus* (29)

L'introduction de schistosomes en Corse par les voyageurs de retour d'Afrique de l'Ouest est la principale hypothèse retenue (22,24,27). En effet, l'hybride *S. haematobium* x *S. bovis* est largement répandu au Sénégal, Mali, Bénin où on retrouve 88% de porteurs (14,23). Comme le montre la figure 10, il existe une étroite relation génétique entre la souche de Corse et celle du Sénégal pour le gène COX1 (ADN mitochondrial) (14).

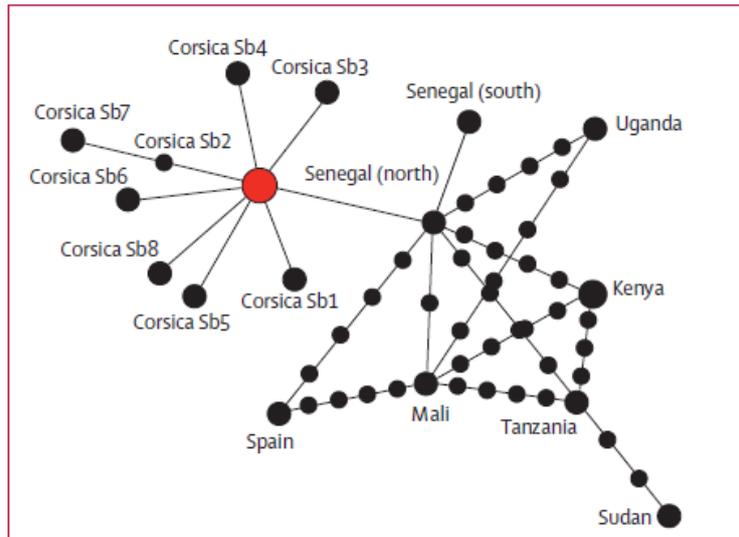


Figure 10: Phylogénétique de *S. bovis* de Corse et d'Afrique par COX1 (14)

Malgré les mesures de prévention mises en place, le foyer de transmission persiste en Corse avec 10 nouveaux cas recensés entre 2015 et 2018 (24,25). L'hypothèse d'un réservoir environnemental est réfutée. L'implication des ruminants et des rongeurs n'a pas été mise en évidence (26).

Cependant, un réservoir humain pourrait jouer le rôle dans le maintien de la parasitose. Le réensemencement des œufs par des personnes infectées en 2013 pourrait participer à la persistance du cycle de transmission (24,26,29). L'inquiétude se porte alors sur la difficulté des tests de dépistage à identifier tous les patients porteurs, et par conséquent sur le risque de propagation dans les zones européennes où *Bulinus truncatus* est endémique (Espagne, Portugal) (24,29). L'intérêt d'un renforcement de la surveillance épidémiologique est primordial.

III. Cycle du parasite

Quelle que soit l'espèce, l'infestation comprend un cycle asexué chez l'hôte intermédiaire (HI), le mollusque, et un cycle sexué chez l'hôte définitif (HD): l'Homme (Figure 11) (30).

1) Cycle asexué

La personne infectée expulse les œufs dans le milieu extérieur par l'émission de selles (*S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. mansoni*, *S. guineensis*) ou par les urines (*S. haematobium*).

Si les conditions climatiques sont favorables (température entre 20 à 30°C) et au contact de l'eau, les œufs éclosent et libèrent un embryon cilié : le miracidium qui a une courte durée de vie, de quelques heures. Ce dernier infeste un HI obligatoire et spécifique d'espèce (*Bulinus sp.* (*S.h* et *S.i*), *Planorbis sp.* (*S.m*) et *Oncomelania sp.* (*S.j*, *S.k*)). Dans ces mollusques se produisent la multiplication et la maturation du miracidium en sporocystes. Ainsi, 4 semaines après, les sporocystes génèrent des milliers de furcocercaires (larves à queue bifide) qui sont libérés.

2) Cycle sexué

Les furcocercaires infectent l'Homme par pénétration transcutanée active au cours d'une baignade en eau douce. Après perte de leur queue, ils deviennent des schistosomules qui circulent dans les vaisseaux sanguins jusqu'à atteindre le plexus veineux mésentérique où la maturation se poursuit. Les larves se transforment alors en vers adultes mâles et femelles (durée de vie moyenne de 3 à 5 ans et jusqu'à 30 ans) qui s'apparient. Le couple migre à contre-courant vers les plexus veineux péricoliques et périrectaux (*S.m*, *S.i*), périverésicaux (*S.h*) ou dans le territoire veineux mésentérique supérieur (*S.j*, *S.k*) et se reproduisent.

La femelle pond une centaine (*S.m* et *S.h*) à un millier (*S.j*) d'œufs par jour. Alors qu'une partie des œufs s'enkystent dans les parois du petit bassin pour *S.h* et dans le parenchyme hépatique et splénique pour *S.m*, *S.k*, *S.j*, d'autres traversent la muqueuse, gagnent la lumière intestinale ou vésicale et sont excrétés par voie urinaire ou fécale, assurant la continuité du cycle (31). Les œufs sont émis 2 à 3 mois après la baignade infestante.

En absence de traitement, l'excrétion des œufs peut durer plusieurs années (13).

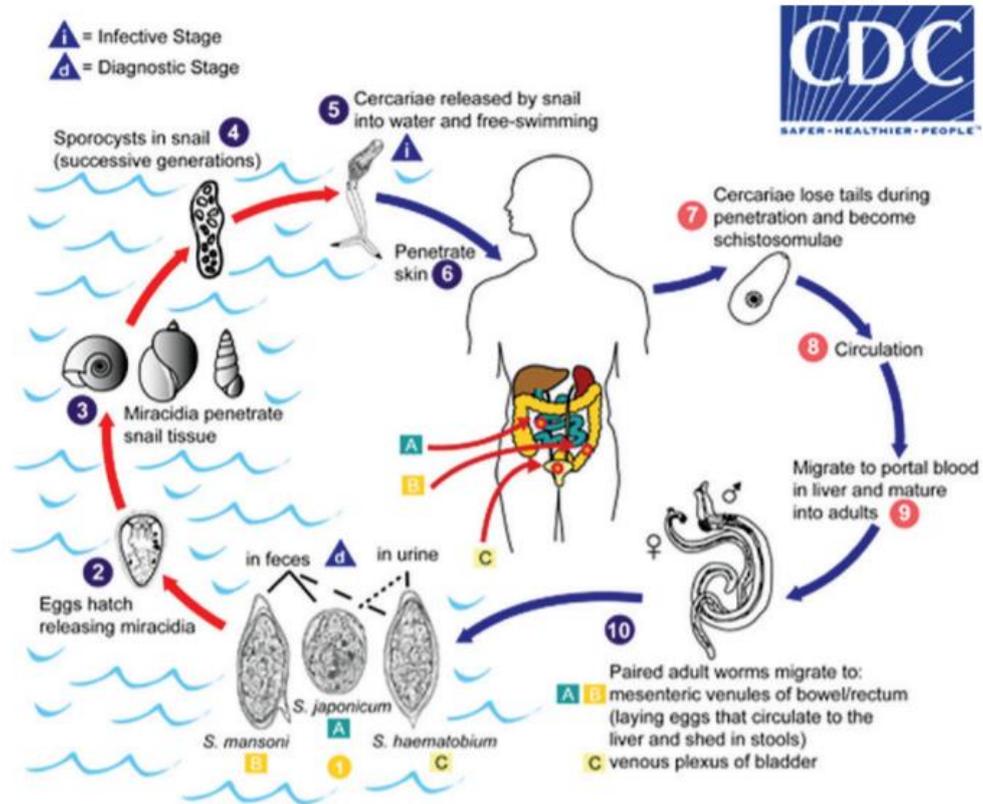


Figure 11 : Cycle de vie du parasite *Schistosoma* sp. (CDC) (30)

IV. Physiopathologie et aspects cliniques

L'infection s'articule en 3 phases : pénétration, invasion et état. La phase d'invasion toxémique est globalement commune à toutes les espèces. Les manifestations cliniques de la phase d'état dépendent de l'espèce en cause et de la localisation des pontes.

1) Phase de pénétration

La pénétration des furcocercaires peut entraîner une dermatite cercarienne s'exprimant par un prurit et une éruption maculo-papuleuse. Elle s'exprime dans les quelques heures jusqu'au 7^e jour suivant la contamination (32).

2) Phase d'invasion (ou aigüe)

La phase d'invasion survient 2 à 12 semaines après la pénétration. Elle se traduit par le développement d'une hypersensibilité immédiate suite à la migration des larves, à la maturation en vers adultes et aux premières pontes. L'hyperéosinophilie sanguine est constante et marquée.



Figure 12 : Angiooedème à type d'urticaire en phase d'invasion (1)

Cette phase est habituellement asymptomatique en zone d'endémie chez les autochtones et plus marquée chez les voyageurs (13,20,33). Elle peut être rythmée d'épisodes de fièvre, de céphalées, de dyspnée asthmatiforme, de diarrhées, d'éruptions urticariennes (Figure 12). Une hépatomégalie peut être présente, et plus rarement une pneumopathie interstitielle (syndrome de Loeffler) ou une encéphalopathie. Cette phase est définie sous le nom de fièvre de Katayama en Asie du Sud-Est et de fièvre de Safari en Afrique tropicale (32).

3) Phase d'état et de complications (ou chronique)

Cette phase se révèle quelques semaines à plusieurs années après la contamination.

La nature des symptômes est déterminée par la localisation des œufs et par l'intensité de l'infection et la réponse immunitaire (31) (Figure 13). La clinique est la résultante d'une

réaction inflammatoire chronique (activation des lymphocytes T CD4+, réponse Th2 et recrutement d'éosinophiles et de macrophages) autour des œufs enchâssés dans les tissus par la formation de granulomes bilharziens (32).

Les formes compliquées ou séquellaires se retrouvent chez les sujets originaires de zones d'endémie non traités, en perpétuel contact avec l'eau douce et réinfectés massivement depuis l'enfance (11,13).

Chez les voyageurs, elle reste peu symptomatique en raison de la faible charge parasitaire.

Les enfants sont sujets à une morbidité importante, et peuvent développer un retard de croissance et une anémie (1,34).

a. Atteinte urogénitale

S. haematobium est responsable d'une hématurie terminale associée à une protéinurie, des signes de cystite (pollakiurie, pesanteur hypogastrique, brûlures mictionnelles), parfois des crises de coliques néphrétiques.

Tardivement, l'inflammation et la fibrose des voies urinaires provoquent des dilatations des uretères et des complications infectieuses et la survenue d'insuffisance rénale. L'inflammation vésicale chronique par les œufs peut aboutir à un carcinome épidermoïde de la vessie (13,35).

Les atteintes génitales (salpingite, endométrite) sont fréquentes chez la femme et peuvent provoquer des troubles de fertilité voire une stérilité ou des grossesses ectopiques. Les schistosomoses urogénitales sont corrélées à un risque plus important d'acquisition et de transmission du VIH en raison des effets immunomodulateurs et de l'agression du tractus génital (36,37).

b. Atteinte intestinale (*S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*)

La schistosomose intestinale se manifeste par une symptomatologie peu spécifique : diarrhées glairo-sanglantes, douleurs coliques, rectorragies, ténésmes. Elle peut se compliquer d'une pathologie hépatosplénique.

c. Atteinte hépatosplénique

La schistosomose hépatosplénique est fréquente et d'installation rapide pour *S.j* et *S.k*, plus lente pour *S.m* (5 à 15 ans). Elle se manifeste précocement par une hépatite granulomateuse (hépatomégalie, fines granulations blanchâtres visibles à la laparoscopie, granulomes centrés

sur un œuf à l'examen histologique). Par la suite, une fibrose spécifique en « tuyaux de pipe » peut se développer. Les fonctions hépatiques sont préservées jusqu'à un stade avancé de la fibrose. A terme, une hypertension portale avec hépatosplénomégalie, un hypersplénisme, des varices œsophagiennes et des hémorragies digestives apparaissent (13).

Il existe des cas de fibrose péri-portale chez les enfants atteints d'une infection chronique à *S. mansoni* dans les régions où la prise en charge est négligée (38).

La forme hépatosplénique n'est jamais retrouvée chez les touristes en retour de zone d'endémie, en raison de la faible charge parasitaire (31).

d. Autres atteintes

Des localisations pulmonaires, cardiovasculaires et neurologiques (39,40) avec atteinte cérébrale ou médullaire (parfois compliquée d'une myélite, compression médullaire ou radiculite) sont décrites et résultent de la migration ectopique du parasite ou de l'embolisation massive des œufs. Elles sont plus fréquentes pour *S. mansoni* et *S. japonicum*.

Site-specific morbidity	Generalized morbidity
<p>Granulomatous reactions and fibrosis in specific organs due to repeated tissue inflammation may cause:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonic polyposis, with chronic pain, bowel ulceration and bloody diarrhea (<i>S. mansoni</i>, <i>S. japonicum</i>) • Periportal liver fibrosis, portal hypertension with haematemesis and splenomegaly (<i>S. mansoni</i>, <i>S. japonicum</i>) • Cystitis and ureteritis with ulceration and haematuria (<i>S. haematobium</i>), which can progress to bladder cancer • Pulmonary hypertension (<i>S. mansoni</i>, <i>S. japonicum</i>, more rarely <i>S. haematobium</i>) • Glomerulonephritis <p>• Female and male pelvic lesions with pain, genital lesions and sexual dysfunction</p> <p>• Central nervous system lesions and spinal cord syndromes</p>	<p>Granulomatous inflammation due to sustained infection and ongoing immune responses may cause:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anaemia of chronic inflammation, and iron deficiency anaemia • Growth stunting and caloric undernutrition • Impaired cognitive development • Increased susceptibility to co-infection and enhanced disease due to co-infection • Fatigue, poor exercise tolerance, and decreased work output • Infertility

Figure 13: Manifestations cliniques lors de la phase d'état (41)

Afin d'éviter toutes ces complications, un traitement médical (et plus rarement chirurgical) est recommandé pour toute schistosomose.

V. Traitements

Le praziquantel (Biltricide®), dérivé synthétique de la tétrahydroisoquinoléine tétracyclique (Figure 14), est le traitement de référence de la schistosomose. Il est efficace et actif sur tous les schistosomes adultes (42,43). Son efficacité est plus faible sur les schistosomules, il ne peut donc être prescrit qu'à la phase d'état (environ 6 à 8 semaines après exposition) (44). En effet, en cas d'administration en phase d'invasion, il conduit à une aggravation de la symptomatologie initiale (dyspnée, fièvre, douleurs abdominales, diarrhée sanglante, myocardite, encéphalite et complications pulmonaires) suite à la lyse parasitaire et la libération massive d'antigènes.

Le traitement des formes d'invasion repose sur l'utilisation d'anti-histaminiques et l'administration d'une corticothérapie orale systématique en cas d'atteinte sévère (45).

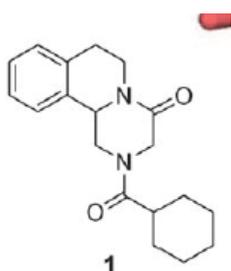


Figure 14: Structure chimique du praziquantel (44)

Malgré son utilisation, le mécanisme d'action du praziquantel est encore mal défini : il entrainerait un influx de calcium par l'intermédiaire des canaux calciques voltage-dépendant, puis une contraction musculaire et une paralysie du ver (46).

Bien toléré, le praziquantel est à prendre au cours d'un repas en prise unique à la posologie de 40mg/kg dans les schistosomoses urogénitales et intestinales (soit 4 comprimés de 600mg chez l'adulte) et à la posologie de 60mg/kg dans les formes artério-veineuses (S.j)(44).

La réponse au traitement est contrôlée à 2 mois, 6 mois et un an par la réalisation d'examens parasitologiques, une formule sanguine et une PCR *Schistosoma*.

Après traitement, des œufs morts peuvent être éliminés pendant plusieurs mois. Un test d'éclosion du miracidium peut les différencier des œufs vivants.

De plus, une hyperéosinophilie et une élévation des anticorps anti-*Schistosoma* sont observées 2-3 mois après le traitement suite à la lyse des vers. Par la suite, le nombre d'éosinophiles sanguins se normalise et les sérologies se négativent en 10 à 12 mois (Tableau 2).

Cependant, la persistance d'une hématurie, l'hyperéosinophilie et la positivité des examens parasitologiques au-delà de 3 mois nécessitent un renouvellement du traitement (47).

Tableau 2 : Surveillance post-thérapeutique (47)

Contrôles post thérapeutiques	Eosinophilie sanguine	Sérologie anticorps	Recherche œufs
2 mois	↗	↗	Œufs morts calcifiés
6 mois	↘	↘	Négatif
12 mois	Normale	Négatif	Négatif

A ce jour, aucune résistance au praziquantel n'a été retrouvée. Néanmoins, la disponibilité et l'utilisation massive et répétée d'une seule thérapie efficace pourraient conduire au développement et à la propagation de résistances (46). Une réduction de la susceptibilité au praziquantel est signalée dans certains régions endémiques (taux de guérison faible de 18% au Sénégal) liée à l'intensité de la transmission et à la charge initiale élevée (48). Ainsi, la recherche de nouvelles molécules anti-schistosomiques est primordiale. Par exemple, le développement d'une thérapie combinée ciblant les différents stades de maturation des schistosomes est une voie de recherche intéressante.

D'autres molécules telles que l'Oxamniquine, l'Artemether et le Furoxan) ont été testées (49). Certains médicaments sont prometteurs mais aucun ne peut être utilisé en tant que substitut ou complément au praziquantel.

Les dérivés de l'artémisinine, utilisés comme anti-malariques, ont démontré leur efficacité sur les formes immatures du schistosome (34). L'association du praziquantel et de l'artemether conduit à un meilleur taux de guérison que l'artemether seul. Pourtant, l'utilisation de ce traitement combiné est limitée car elle conduit au développement de résistances du *Plasmodium* dans les régions co-endémiques (42,50).

En terme de prophylaxie collective, le praziquantel est aussi utilisé comme traitement préventif de masse destiné aux personnes à risque dans les régions endémiques.

VI. Prévention

L'OMS a mis en place des programmes nationaux de lutte contre la schistosomose dans les pays endémiques. L'objectif est de prévenir et de réduire la transmission et la morbidité à long terme et par la suite d'éradiquer la schistosomose (51).

La stratégie consiste à agir sur :

- l'aménagement de l'environnement avec un accès à l'eau, un assainissement de l'eau et une amélioration de l'hygiène, et pour cela une nécessité d'amélioration du niveau socio-économique ;
- la destruction des hôtes intermédiaires ;
- l'éducation sanitaire afin de changer les comportements ;
- et surtout sur le traitement de masse par chimiothérapie préventive (CP) (10).

Au début du XX^{ème} siècle, les premières tentatives de lutte contre la schistosomose ont eu lieu en Egypte et au Japon (52). La destruction des mollusques par du niclosamide s'est avérée être une méthode difficile en raison du coût élevé et du caractère polluant (31).

En revanche, l'administration à grande échelle de praziquantel a montré son efficacité en terme de réduction de la morbidité et sur la transmission de la schistosomose dans des pays tels que l'Egypte, le Brésil, le Burkina Faso, le Cambodge, la Chine, le Maroc ou l'Ouganda (53–55).

Ainsi, l'Assemblée Mondiale de la Santé recommande de poursuivre les activités de lutte contre la schistosomose dans les zones de forte transmission, d'assurer l'accès au traitement et de surveiller la qualité et l'efficacité des médicaments (56). Elle préconise d'administrer à grande échelle des traitements périodiques d'une dose orale de 40mg/kg de praziquantel à tous les enfants d'âge scolaire et les adultes exposés, particulièrement les femmes enceintes (10).

Cinquante-deux pays d'endémie de transmission modérée à forte sont concernés par ce traitement de masse (Tableau 3).

Tableau 3 : Statut des pays d'endémie de schistosomose dans les régions de l'OMS (51)

Groupe	Pays et territoires
Pays ou territoires où la chimioprévention est nécessaire	Région de l'Afrique : Afrique du Sud, Angola, Bénin, Botswana, Burkina Faso, Burundi, Cameroun, Congo, Côte d'Ivoire, Érythrée, Éthiopie, Gabon, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée-Bissau, Guinée équatoriale, Kenya, Liberia, Madagascar, Malawi, Mali, Maurice, Mozambique, Namibie, Niger, Nigeria, Ouganda, Rwanda, Sao Tome et Principe, Sénégal, Sierra Leone, Swaziland, Tchad, Togo, République centrafricaine, République démocratique du Congo, République unie de Tanzanie, Zambie, Zimbabwe Région des Amériques : Brésil, Venezuela (République bolivarienne du) Région de l'Asie du Sud-Est : Indonésie Région de la Méditerranée orientale : Égypte, Somalie, Soudan, Soudan du Sud, Yémen Région du Pacifique occidental : Cambodge, Chine, Philippines, République populaire démocratique lao
Pays ou territoires où une actualisation est nécessaire aux fins de la planification et de la mise en œuvre des interventions	Région des Amériques : Sainte Lucie, Suriname Région de la Méditerranée orientale : Arabie saoudite, Iraq, Libye, Oman, République arabe syrienne
Pays ou territoires où une évaluation est nécessaire pour vérifier si la transmission a déjà été interrompue	Région de l'Afrique : Algérie, Maurice Région des Amériques : Antigua, Guadeloupe, Martinique, Montserrat, République dominicaine Région de l'Asie du Sud-Est : Inde, Thaïlande Région de l'Europe : Turquie Région de la Méditerranée orientale : Djibouti, Iran (République islamique d'), Jordanie, Liban, Maroc, Tunisie Région du Pacifique occidental : Japon, Malaisie

* Source: http://www.who.int/neglected_diseases/ntdd/ita/sch/sch.html

Le but est d'obtenir une couverture géographique de 100% en 2020 (Figure 15).

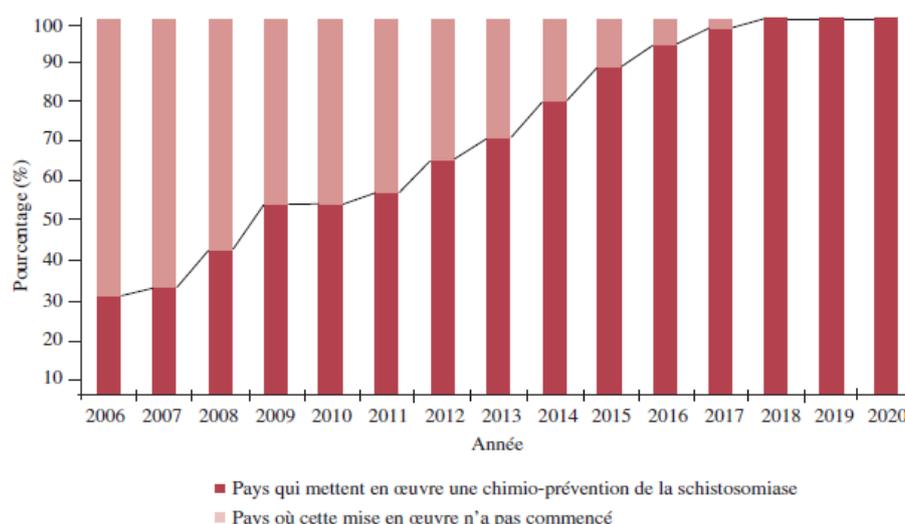


Figure 15: Proportion de pays mettant en œuvre la chimioprévention de la schistosomose de 2006 à 2020 (51)

En Afrique subsaharienne, cette stratégie n'a pas été optimale en raison d'un nombre relativement important de personnes n'ayant pas eu accès à ce médicament (environ 80%) par défaut de ressources humaines et financières (10,57).

En réalité, 5% des personnes exposées semblent avoir reçu un traitement efficace (Figure 16). En effet, seulement 50% des individus ayant accès au traitement étaient observants. De plus, l'efficacité du praziquantel en préventif n'est estimée qu'à 50% en raison de l'absence d'action sur les schistosomules et donc la possibilité d'une réinfection dès son arrêt (58).

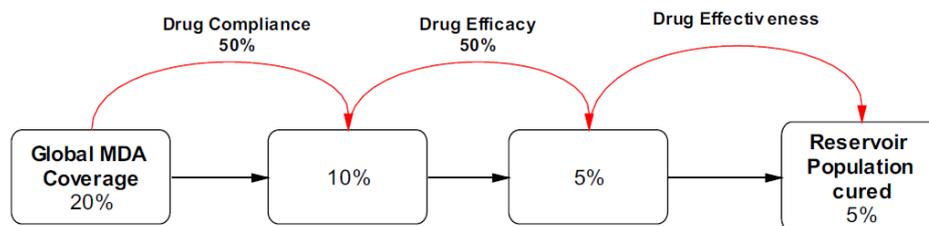


Figure 16: Population cible recevant une chimioprévention dans le contrôle de la schistosomose (10)

Depuis, l'OMS a contribué à une meilleure disponibilité du praziquantel, à la mise en œuvre de la chimioprévention dans de nouveaux pays et à l'amélioration de la notification.

En 2018, 95,3 millions de personnes (76,2 millions d'enfants d'âge scolaire et 19,1 millions d'adultes) ont bénéficié de la CP, ce qui donne une couverture mondiale de 61,2% chez les enfants et 18,2% chez les adultes. Au total, 34 pays (soit 65,4%) ont signalé qu'ils avaient administré des traitements contre la schistosomose en 2018 (59). Les données manquantes expliquent la diminution du nombre de patients traités en 2018 par rapport à 2017 (Figure 17).

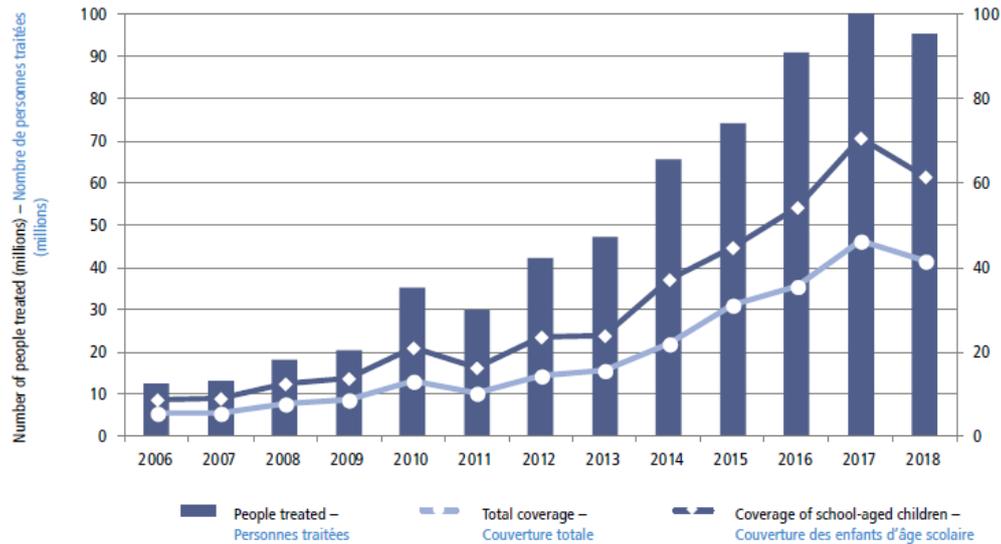


Figure 17: Nombre de personnes ayant reçu une chimioprévention contre la schistosomose dans le monde entier de 2006 à 2018 (OMS 2019) (59)

Pour conclure, les plans d'élaboration du traitement de masse ne suffisent pas à eux seuls à contrôler ou à éliminer la schistosomose à long terme. Les mesures complémentaires évoquées ci-dessus jouent un rôle important. La prise d'une association de praziquantel 60mg/kg fractionnée et 6mg/kg d'artémether a été proposée afin d'agir sur tous les stades du parasite (10).

En parallèle, des essais cliniques sont en cours d'élaboration afin de développer un vaccin contre *S. mansoni* et *S. haematobium* (60).

En Europe, dans le but de réduire l'incidence des cas importés, les voyageurs doivent être sensibilisés au risque de schistosomose dans les régions africaines. Les consultations après le voyage, surtout pour les expatriés, sont utiles étant donné l'incidence élevée d'infections asymptomatiques (11). En Corse, des plans d'action pour sensibiliser le public et des installations sanitaires pour les nageurs sont mis en place pour éviter le développement d'un réservoir local (21).

Partie II : Diagnostic biologique

Une symptomatologie non spécifique peut rendre le diagnostic clinique difficile. Il est impératif de disposer d'outils diagnostiques ayant une bonne sensibilité et spécificité pour détecter les personnes infectées, les traiter rapidement et limiter les complications.

Il n'existe pas de consensus concernant la prescription des examens biologiques. Les recommandations australiennes (61) et le HCSP (27) préconisent une sérologie en 1^{ère} intention chez les migrants et les voyageurs en Corse, puis des examens complémentaires (Examen Parasitologique des Selles (EPS) et des Urines (EPU), échographie) en cas de positivité.

Selon Gray *et al* (62) et les recommandations françaises (Guide Comede 2015), la sérologie et l'examen parasitologique des excréta doivent être prescrits de façon concomitante. Un dépistage systématique (NFS, EPS, sérologie +/- EPU) est proposé aux migrants de retour d'une zone d'endémie.

I. Diagnostic non spécifique

Une hyperéosinophilie et une augmentation des IgE sont plus marquées en phase d'invasion.

Une hyperleucocytose peut être retrouvée (10 à 25G/L).

L'hématurie peut se présenter dans les schistosomoses urogénitales.

II. Diagnostic spécifique

1) Microscopie

Selon l'OMS, l'examen microscopique des œufs de schistosomes dans les selles, les urines et les biopsies est l'examen de référence. En pratique, il est pertinent chez des patients atteints de schistosomose chronique, dans les régions à forte prévalence (20).

La microscopie permet d'établir un diagnostic d'espèce grâce à la taille et la morphologie des œufs (Figure 18) et la nature du prélèvement (31).

Le diagnostic parasitologique a l'avantage d'avoir une haute spécificité estimée à 100% (63). Cependant, le diagnostic est retardé et n'est contributif qu'à partir de la 6e semaine post-contamination en moyenne (5).

De plus, la recherche des œufs est une technique peu sensible (5-50%), surtout en cas de faible charge parasitaire, chez les voyageurs notamment. En raison de la variabilité de l'excrétion journalière des œufs, il est donc nécessaire de renouveler les prélèvements (2).

Ainsi, la microscopie présente un intérêt limité dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique. La sensibilité de cette méthode est dépendante de l'expérience de l'opérateur et de la charge parasitaire, d'où la nécessité de compléter cet examen par une sérologie, technique plus sensible.



Figure 18: Morphologie des œufs spécifiques d'espèce au microscope (31)

a. Examen Parasitologique des Urines (EPU)

L'EPU s'effectue classiquement sur les urines matinales (entre 10h et 14h), après une activité physique pour améliorer la concentration des œufs (efficacité jamais prouvée à ce jour), ou sur les urines des 24 heures. Les urines sont traitées par la méthode de sédimentation, centrifugation ou par filtration sur membrane de polycarbonate. Le culot est observé par microscopie optique.

b. Examen Parasitologique des Selles (EPS)

Trois prélèvements à 2 à 3 jours d'intervalle sont nécessaires pour le diagnostic des schistosomoses intestinales. L'EPS comprend un examen macroscopique, un état frais et 2 méthodes de concentration différentes. Grâce à son moindre coût, sa haute spécificité et sa facilité d'utilisation, la technique de Kato-Katz est recommandée par l'OMS et permet une quantification des œufs (17).

c. Biopsies

La biopsie n'est recommandée qu'en cas de lésions suspectes ou face à des symptômes évocateurs et des examens microscopiques et sérologiques négatifs.

2) Techniques immunologiques

a. Sérodiagnostic

Les anticorps anti-Schistosoma apparaissent 4 à 6 semaines après la baignade infestante et persistent pendant plusieurs années.

Le sérodiagnostic, de bonne sensibilité, correspond à l'examen de 1^{ère} intention dans les régions non endémiques. Il présente un intérêt dans le dépistage de la schistosomose aiguë

chez les voyageurs et les migrants en retour de zones d'endémie, et dans le diagnostic en cas d'examen microscopique négatif et de symptômes non spécifiques (11,31,64).

En revanche, cette méthode ne permet pas de distinguer les espèces, ni d'évaluer le caractère évolutif ou résolu de cette pathologie puisque l'examen reste longtemps positif. Malgré la sensibilité et spécificité équivalente à la PCR, le sérodiagnostic ne peut différencier une infection passée d'une infection active par rapport aux méthodes directes de diagnostic (65).

En pratique, pour une sensibilité optimale, les autorités sanitaires ont recommandé l'utilisation simultanée de 2 techniques de principe différent (ELISA et hémagglutination indirecte) utilisant 2 antigènes parasitaires de stades différents (œufs et adulte). Les données de la littérature montrent que la sensibilité des tests sérologiques combinés se situe entre 78 à 100% et la spécificité de 87 à 98% (66).

En cas de discordance ou de résultat douteux, le western blot basé sur l'immunoempreinte (bandes spécifiques du genre *Schistosoma*) reste un examen de confirmation sérologique (27). L'immunoblot a prouvé son efficacité dans le diagnostic de la schistosomose urogénitale et intestinale (5).

La majorité des tests de détection d'anticorps utilisés dans le diagnostic de la schistosomose utilise les antigènes de *S. mansoni* (17).

- L'Immunofluorescence indirecte (IFA) détecte la réaction entre les antigènes parasitaires (coupes de vers adulte, cercaires et œufs) et les anticorps IgG et IgM dans le sérum ou d'autres fluides au microscope. Cette méthode a été utilisée dans les zones de faible prévalence, combinée à d'autres procédures pour augmenter la sensibilité et la spécificité. L'inconvénient est le coût des réactifs et l'utilisation de microscopes.
- L'hémagglutination indirecte (HAI) utilise des érythrocytes sur lesquels sont fixés des antigènes de vers adultes. Elle détecte la réactivité entre les anticorps dans le sérum de l'individu et les antigènes de *Schistosoma* (Figure 19). En raison de sa simplicité et sa sensibilité, ce test est utilisé dans les enquêtes à grande échelle et dans la surveillance des schistosomoses dans les zones endémiques (17).

Exemple :

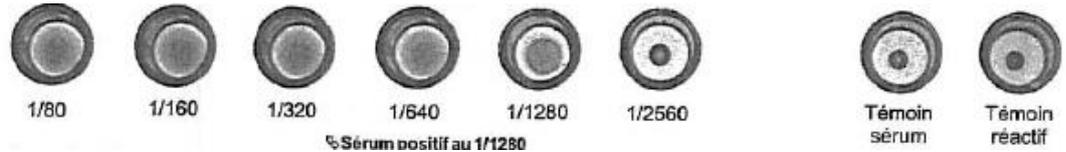


Figure 19: Titrage d'un sérum positif par IHA (Notice)

➤ ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

C'est un test immunoenzymatique basé sur la détection des anticorps IgG dirigés contre les antigènes purifiés solubles d'œufs (SEA) de *Schistosoma mansoni*.

Une sensibilité de 94% est obtenue pour *S.m*, 90% pour *S.h*. Elle est moins bonne pour *S. japonicum* et *S.mekongi* (environ 50%) (61).

D'autres cibles aussi performantes et à moindre coût existent. L'antigène cercarial de *S. mansoni* (*SmCTF*) donne une moins bonne sensibilité pour les infections à *S. japonicum* (67). L'antigène comprenant la fraction cationique 6 CEF6 des œufs est un marqueur spécifique et utile pour le suivi de l'efficacité du traitement. On observe une décroissance des anticorps dirigés contre CEF6 après traitement. Cet antigène peut être corrélé à l'intensité de l'infection (67,68).

➤ Western Blot (WB)

Les antigènes bruts (vers de *S. mansoni* et *S. haematobium*) après séparation électrophorétique sont fixés sur une membrane de nitrocellulose découpée en bandelettes. Les anticorps spécifiques anti-IgG fixés aux antigènes sont révélés par l'ajout de la phosphatase alcaline anti-IgG sous forme de bandelettes violettes (Figure20).

Le WB est une technique très sensible (98,9%) dotée d'une excellente valeur prédictive négative (98%) et spécificité (98,2%) (63).

Les anticorps détectés par le WB sont connus pour persister plus longtemps (plusieurs années) après traitement par comparaison à l'ELISA ou l'IHA. (5).

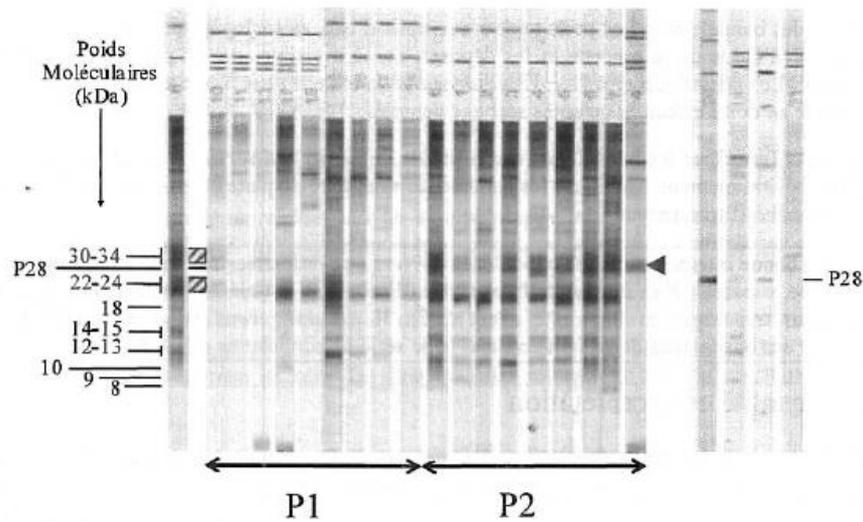


Figure 20: Exemple de profils rencontrés par Western blot (zone entre 8 et 34kDa)

Huit bandes spécifiques sont rencontrées : P8, P9, P10, P12-13, P14-15, P18, P22-24, P30-34 (poids moléculaires) (Notice LDBIO Diagnostics[®]).

La présence de l'une des bandes 30-34 ou 22-24 reflète une infection à *Schistosoma*.

Si la bande 30-34 est isolée, elle doit être large pour être considérée.

La bande 28 est non spécifique de *Schistosoma*.

Une différence de profil est observée entre l'infection à *S. mansoni* (P1) et *S. haematobium* (P2).

Une alternative basée sur la détection d'antigènes circulants dans le sérum ou l'urine à l'aide d'anticorps monoclonaux est disponible.

b. Détection d'antigènes

Des techniques rapides et à moindre coût ont été développées pour faciliter le dépistage sur le terrain dans les programmes de contrôle. Elles sont basées sur la détection d'antigènes dérivés du schistosome, protéoglycanes, spécifiques du genre et non spécifiques d'espèce : l'antigène cathodique circulant CCA et l'antigène anodique circulant CAA. Ces antigènes sont relargués par le ver adulte dans le sang et l'urine 3 à 5 semaines post-infection (69).

Ces tests immunochromatographiques permettent le diagnostic des infections actives et l'évaluation de l'efficacité du traitement dans les régions endémiques mais manquent de

sensibilité en cas de faible charge parasitaire (68,70). En revanche, malgré leur bonne spécificité, ces méthodes ne permettent pas de faire le diagnostic d'espèce.

Des sensibilités similaires sont obtenues avec la recherche de CAA dans le sérum et de CCA dans l'urine (17). Il n'est pas démontré d'augmentation de la sensibilité en combinant une détection simultanée du CAA et du CCA (71).

Le POC-CCA urinaire a démontré sa performance sur le terrain dans le dépistage de *S. mansoni* dans les régions endémiques (72). En effet, il est doté d'une meilleure sensibilité (par comparaison à la microscopie) (73). Cependant, il présente des limites dans le diagnostic des schistosomoses urinaires à *S. haematobium*.

La sensibilité du test CAA est faible d'où le développement de la technique UCP-LF (Up-Converting Phosphor Lateral Flow) sur sérum. Cette méthode est plus performante et efficace dans la détection de toutes les espèces mais ne peut être utilisée sur le terrain (17).

3) Techniques moléculaires

Les techniques de biologie moléculaire ont tendance à se développer en raison de la faible sensibilité des méthodes standards.

Introduite récemment, la technique LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) constitue une méthode alternative à la PCR conventionnelle en raison de sa forte sensibilité, sa simplicité, sa rapidité d'utilisation et son efficacité d'amplification. Elle présente un fort potentiel dans la détection précoce des schistosomes sur le terrain dans les pays à faibles ressources (74,75).

De nos jours, la PCR en temps réel par sonde Taqman®, plus avantageuse en terme de sensibilité, de quantification en comparaison à la PCR classique en point final, est largement utilisée en routine dans les laboratoires de biologie médicale pour le diagnostic de la schistosomose.

a. Principe de la PCR en temps réel Taq man

La PCR en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique. En revanche, l'amplification est détectée tout au long de la PCR par émission de fluorescence d'une sonde. La sonde Taqman® est un oligonucléotide complémentaire de l'un des brins de la séquence cible (figure 21).

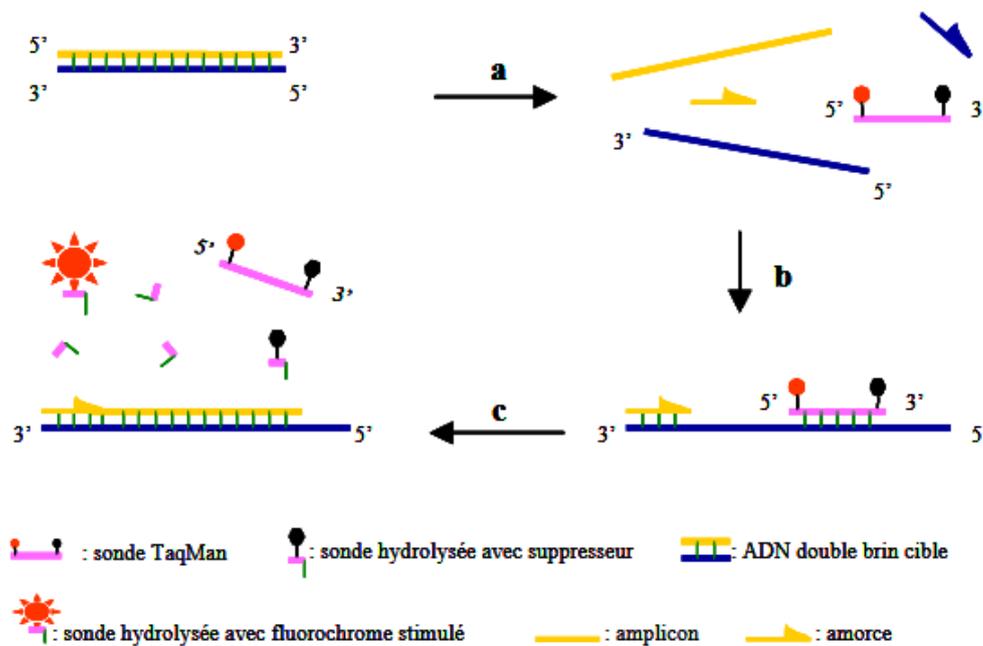


Figure 21 : Principe d'une PCR avec sonde TaqMan (76)

- a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence

La PCR quantitative en temps réel présente plusieurs avantages. Le principal est la corrélation de l'intensité de la fluorescence à la quantité d'amplicons produits (évaluée par la détermination du Ct (cycle seuil)). Par ailleurs, l'efficacité de la PCR quantitative en temps réel est d'autant meilleure que la taille des amplicons est petite (50-150pb). Enfin, l'utilisation d'une sonde Taqman® augmente la spécificité des amplicons générés.

b. Etat des lieux des PCR *Schistosoma* et leur cible

La plupart des PCR décrites détectent une ou deux espèces de schistosomes humaines (Annexe 1).

Le génome de *Schistosoma*, de grande taille, (363 Mb pour *S. mansoni*) est riche en séquences répétées (40% du génome) (dont 72 familles de rétrotransposons LTR (Long Terminal Repeat) et non LTR) (77,78).

Pontes *et al* (79) ont été les premiers à utiliser la PCR ciblant la séquence répétée en tandem de 121pb de *Sm 1-7* (12% du génome) décrite par Hamburger *et al* (80) pour détecter spécifiquement *S. mansoni* dans les selles et le sérum (81–83).

En 2010, Oliveira *et al* (84) ont démontré que la PCR basée sur l'ARN28S était plus sensible que la PCR ciblée sur *Sm 1-7* pour détecter *S. mansoni* dans les échantillons fécaux.

L'ARN ribosomique 28S et 18S reste une région très conservée, considérée comme un excellent marqueur d'identification et utilisée dans les études phylogénétiques (85). Zhou *et al* (86) ont développé une PCR en temps réel ciblant l'ARN 18S pour détecter *S.j* dans les excréments de souris et les échantillons de sérums. Cette cible présente des similarités avec *S. malayensis*, *S. mekongi* et *S. sinensiu*, d'où la possibilité d'en faire un outil diagnostique des schistosomoses asiatiques. Dans l'étude de Cnops *et al* (87), l'ARNr 28S déjà décrit par Sandoval *et al* (88), a permis le développement d'une PCR en temps réel détectant les espèces infectieuses pour l'Homme (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* et *S. japonicum*) dans les selles, les urines et le sérum.

En 2013, Cnops *et al* (89) a ciblé l'amplification de la séquence répétée *Dra1* (15% du génome) pour diagnostiquer les schistosomoses urogénitales à *S. haematobium* dans les sérums. Cependant, cette séquence est commune avec *S. mattheei*, *S. magrebowiei*, *S. bovis*, *S. curassoni* et *S. intercalatum* mais pas avec *S. mansoni* (90).

Guo *et al* (91) ont identifié 29 rétrotransposons dans le génome de *S. japonicum*. L'amplification de la séquence hautement répétitive du rétrotransposon *SjR2* (230pb) (92) et du rétrotransposon *SjCHGCS19* (91) permet la détection de *S. japonicum* dans les sérums de lapins et de patients, avec une spécificité et une sensibilité élevées.

Par ailleurs, l'ADN mitochondrial, uniquement à hérédité maternelle, est une cible intéressante en raison de :

- sa résistance, liée à sa forme circulaire
- sa forte sensibilité de par le nombre de copies des séquences et le nombre de mitochondries par cellule
- sa grande spécificité d'espèces avec un taux de mutation plus élevé que l'ADN nucléaire (17).

Actuellement il existe des banques de données pour les génomes mitochondriaux complets pour 6 espèces de schistosomes (*S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. malayensis*, *S. spindale*, *S. mansoni* et *S. haematobium*).

Dans la littérature, les PCR ciblent habituellement les gènes mitochondriaux cytochrome oxydase 1 (COX1) et NADH déshydrogénase I (93–96) (Figure 22). Kato-Hayashi *et al* (97) ont développé une PCR multiplex ciblée sur COX1, capable d'identifier et de différencier *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* et *S. mekongi*. De même, Ten Hove *et al* (96) ont utilisé le gène COX I pour différencier *S. mansoni* et *S. haematobium*, mais la sensibilité semblait inférieure à la PCR ITS2 décrite par Obeng *et al* (72), qui détecte les 2 espèces sans différenciation.

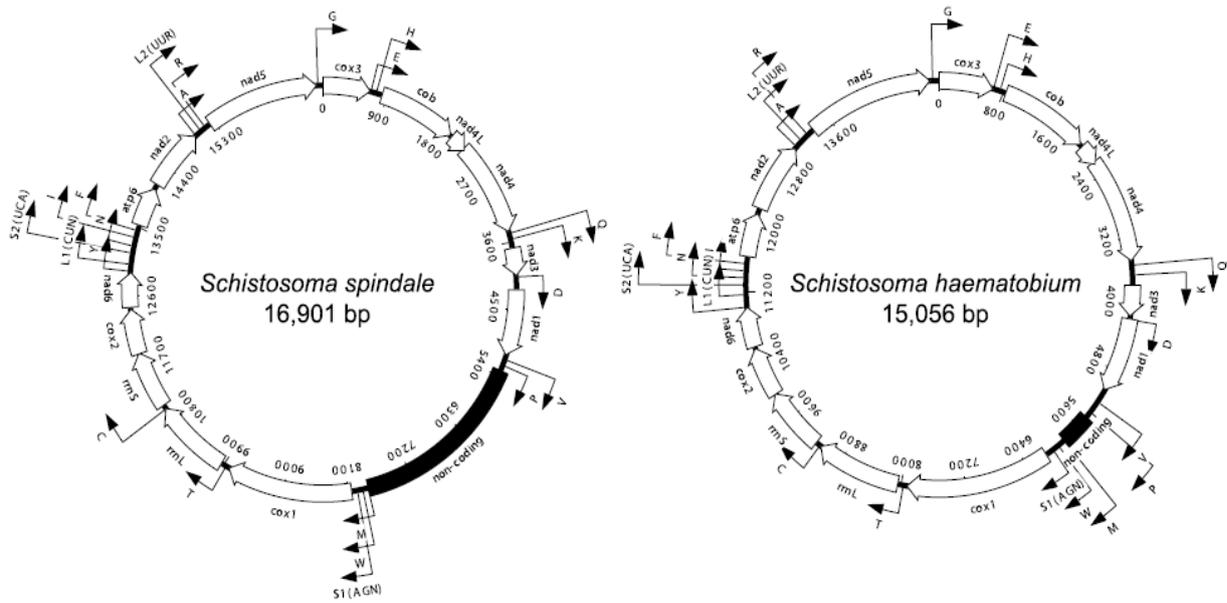
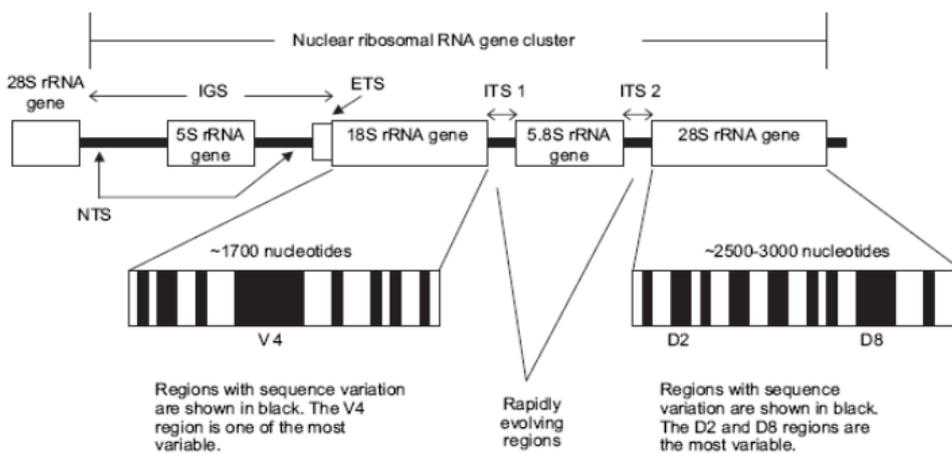


Figure 22: Schéma représentatif des génomes mitochondriaux de *S. spindale* et *S. haematobium* (98)

La séquence ITS (Internally transcribed Spacer) est une cible sélectionnée pour distinguer les espèces. La région ITS est une région de l'ADN ribosomique des eucaryotes composée de sous régions (ITS1, ITS2 et le gène 5,8S), non codante et hautement polymorphe (Figure 23). La variabilité de cette séquence permet une identification spécifique de l'espèce. Dans l'étude de Sandoval *et al* (88), ITS2 était amplifiée pour détecter spécifiquement *S.h* dans des échantillons d'urines.



(Source du Círad)

Figure 23: Opéron du gène ARN ribosomique chez les eucaryotes (99)

Enfin, d'autres biomarqueurs sont découverts et sont spécifiques d'espèces de schistosomes (100). Par exemple, les miRNAs dérivés de parasites (miR-3479, miR-10, miR-3096, miR-0001, miR-277, Bantam) sont des ARN non codants détectables dans les fluides biologiques à différentes intensités d'infection, avec une sensibilité et une spécificité élevées (17).

c. Performances de la PCR par rapport aux techniques standards

La PCR est une méthode alternative valable pour diagnostiquer les infections à *Schistosoma*. En effet, l'étude de Kato-Hayashi *et al* (93) a trouvé des résultats concordants entre la PCR et la technique gold-standard (Kato-Katz) puisque l'ADN a été détecté dans l'urine et le sérum de tous les patients positifs par technique Kato-Katz (100% de sensibilité).

Comme la méthode Kato-Katz, la PCR présente une capacité de quantification et donnera une estimation de la charge parasitaire.

La PCR est également dotée d'une haute spécificité (100%), prouvée dans notre laboratoire lors de l'évaluation de la PCR spécifique à *S.m* et *S.h* pour laquelle il n'a été obtenu aucun positif chez les patients n'ayant jamais voyagé en zone d'endémie et aucune réaction croisée avec les autres parasites (5).

De même, la PCR a su démontrer sa performance grâce à sa haute sensibilité. Dans l'étude de Pontes *et al* (83), la détection de l'ADN parasitaire se révélait être 10 fois plus sensible que la technique Kato-Katz. Effectivement, un diagnostic positif a été obtenu pour des selles contenant à peine 2,4 œufs par gramme de fèces, avec une limite de détection de seulement 1fg d'ADN de schistosome par opposition à la technique KK, estimée à 20 œufs par gramme de selles. Cette sensibilité élevée permet à la PCR d'être utilisée dans le diagnostic des schistosomoses de faible charge parasitaire (84,101). Contrairement à la méthode Kato-Katz, un seul échantillon suffit pour conduire à la positivité de la PCR (79).

De plus, cette technique a prouvé son efficacité dans le diagnostic puisqu'elle a permis de rattraper des résultats rendus faussement négatifs par l'examen parasitologique des selles (79,93,95). D'ailleurs, dans l'étude menée à Toulouse sur 412 échantillons issus de patients suspects de schistosomose et par comparaison à la microscopie, la mise en place de la PCR

en temps réel spécifique de *S.m* et *S.h* a participé à l'augmentation significative de la sensibilité du diagnostic de 4% à 10,5% pour *S.h* dans les urines et de 33,7 à 48,8% pour *S.m* dans les selles (5).

Enfin, par comparaison aux techniques standards, la PCR a la capacité d'amplifier l'ADN de schistosome dans divers milieux biologiques (sérum (89), plasma, biopsie, selles (96), urines (88).

Dans le sérum, la PCR montre un intérêt dans la détection précoce de l'ADN parasitaire, dès la première semaine post-infection (82,92,102).

L'étude de Wichmann *et al* (81) menée de janvier 2009 à avril 2012 dans 11 centres européens de médecine tropicale et de médecine du travail a montré l'avantage de la PCR sérique en temps réel à diagnostiquer les schistosomoses aiguës des voyageurs de retour d'une zone d'endémie avec une sensibilité de 92%. Cela a été décrit également dans l'étude Clerinx *et al* (103), dans laquelle une sensibilité de 100% chez des voyageurs exposés a été obtenue.

Au CHU de Toulouse, la sensibilité globale de la PCR sérique a été évaluée à 72,7% et a atteint 94,1% chez les patients avec un EPS positif (5).

d. Applications de la PCR *Schistosoma*

La PCR est un outil de diagnostic sensible et spécifique pouvant être utilisé en alternative à la microscopie et en tant que méthode de référence combinée au sérodiagnostic par WB. Elle permet de confirmer la sérologie et apporte une valeur ajoutée en identifiant les espèces de schistosomes (y compris dans les infestations mixtes) (5).

Dans le sérum, elle dévoile un intérêt dans le diagnostic précoce des schistosomoses aiguës d'importation (avant la mise en évidence des œufs dans les excréta). Par conséquent, elle permet d'orienter la prise en charge plus rapidement et d'éviter les complications tardives (81).

De même, cette technique de biologie moléculaire est utile dans l'évaluation de l'efficacité du traitement (5). A 1 mois du traitement, la PCR dans le sérum reste positive, détectant la persistance d'ADN probablement libéré des œufs enchâssés dans les tissus. A ce stade, le contrôle de l'efficacité du traitement ne peut s'effectuer que par un examen microscopique des excréta. En outre, à partir de 3 mois, une décroissance de la positivité de la PCR est observée, d'où son rôle dans le contrôle d'efficacité du traitement et de guérison à 1 an (Figure 24).

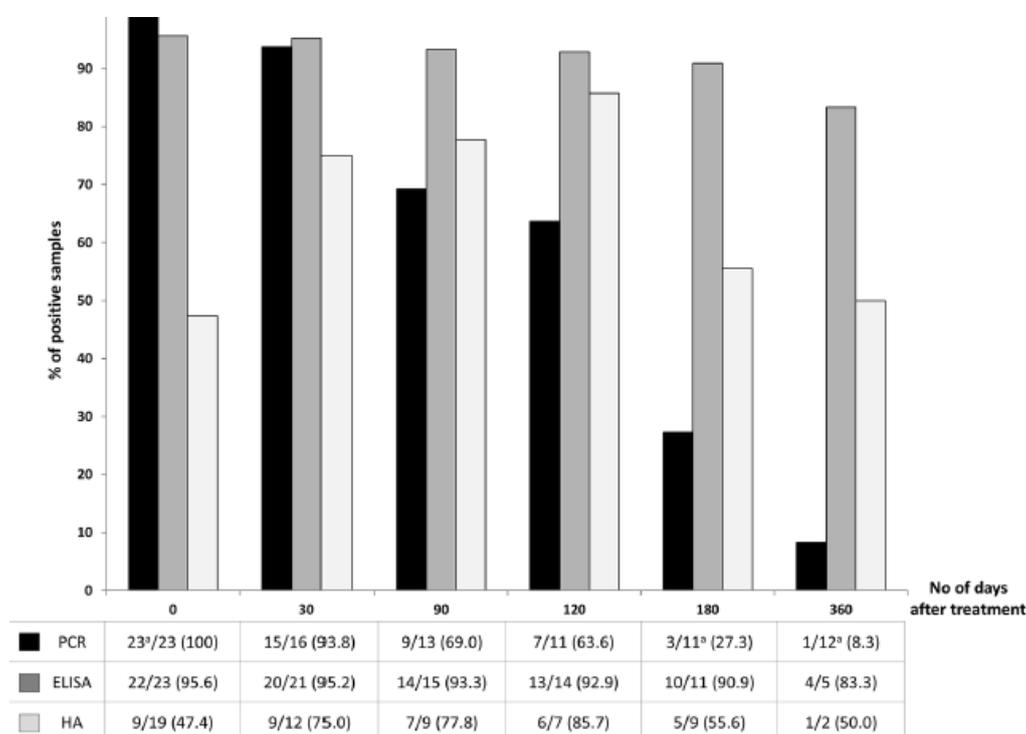


Figure 24 : Cinétique du taux d'échantillons positifs dans le sérum par PCR, ELISA et HA après traitement (5)

En routine, au CHU de Toulouse, une PCR en temps réel ciblant les séquences génomiques répétées de *S. mansoni* (*Sm1-7*) et *S. haematobium* (*Dra-1*) permet de confirmer le diagnostic de schistosomose.

Cependant, cette technique ne détecte pas les espèces asiatiques. Il est apparu nécessaire de développer une PCR détectant toutes les espèces de schistosomes, ceci d'autant plus que l'examen parasitologique des selles ne sera vraisemblablement plus réalisé d'ici quelques années.

Partie III : Développement d'un outil de diagnostic moléculaire pan-*Schistosoma*

I. Objectif

Au CHU de Toulouse comme dans beaucoup de laboratoires d'analyses médicales, l'examen parasitologique des selles classique (microscopique) sera de moins en moins réalisé. Plusieurs raisons expliquent l'abandon de cette technique diagnostique :

- Le développement d'outils moléculaires, malgré leur performance actuelle modérée pour les helminthes, devrait se généraliser.
- La moindre fréquence des helminthiases et la difficulté du maintien des compétences des opérateurs a pour conséquence une moindre performance des diagnostics par méthodes optiques.

Une PCR de routine en temps réel est disponible au laboratoire, elle met en évidence spécifiquement *S. mansoni* et les espèces du complexe *S. haematobium*, espèces les plus observées.

La stratégie envisagée au laboratoire de parasitologie du CHU de Toulouse est de mettre en place un outil de diagnostic sensible, de recours, pour diagnostiquer toute infection à *Schistosoma sp.* quelle qu'en soit l'espèce.

II. Matériel et méthodes

1) Design de la PCR Pan-*Schistosoma*

La première étape de notre travail a été de designer *in silico* des amorces et une sonde spécifiques permettant d'amplifier un fragment d'ADN commun à toutes les espèces. L'intérêt était d'inclure dans le panel de détection de la PCR pan-*Schistosoma* toutes les souches africaines du complexe *haematobium*, *mansoni* ainsi que toutes les espèces asiatiques.

a. Choix de la cible

En premier lieu, nous avons voulu mettre en évidence une séquence génomique répétée et commune à toutes les espèces. Aucune séquence multi-répétée, comme le gène *Dra1*, n'a pu être identifiée.

Deux cibles potentielles identifiées chez les eucaryotes étaient alors intéressantes : l'ADN mitochondrial et les séquences ITS.

Pour cela, les séquences d'ADN ribosomal 18S (fragment ITS2) et d'ADN mitochondrial ont été récupérées sur GenBank[®] NCBI (National Center for Biotechnology Information - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'ensemble des séquences a été aligné sur BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool) ; ce qui a permis de sélectionner les régions d'homologies.

L'alignement des régions génomiques choisies a été réalisé grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor sur les souches suivantes : *S. mansoni*, *S. rodhaini*, *S. mattheei*, *S. haematobium*, *S. haematobium x S. bovis*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*, *S. bovis*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. malayensis* dans le but de trouver une région idéale.

b. Choix des amorces et de la sonde

Une fois la cible sélectionnée, le logiciel PrimerExpress[®] a permis de designer les séquences d'ADN des amorces et de la sonde spécifique aux brins du fragment d'intérêt.

La spécificité des amorces et de la sonde a été vérifiée *in silico* par BioEdit Sequence Alignment Editor[®].

2) Validation et application de la PCR *pan-Schistosoma*

a. Souches parasitaires

Des souches de vers adultes de schistosomes, d'espèces différentes, ont été fournies par l'équipe de recherche du laboratoire Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements à l'université de Perpignan (Pr Jérôme BOISSIER), pour la mise en œuvre de la PCR *pan-Schistosoma*. Pour chaque espèce, nous disposons de 3 échantillons comprenant 2 vers chacun, fixés à l'éthanol. Ces différentes espèces étaient les suivantes :

- Espèces du complexe de *S. haematobium* : souche animale *S. bovis* (*Sb*), *S. haematobium* (*Sh*), hybride *S. bovis* x *S. haematobium* (*F*), autre souche hybride *S. bovis* x *S. haematobium* (*F'*)
- Espèces du complexe *S. mansoni* : *S. mansoni* du Sénégal (*SmS*), *S. mansoni* du Brésil (*SmB*), souche animale *S. rodhaini* (*Sr*)

Nous avons pu aussi avoir par le Pr Jérôme BOISSIER l'ADN de *S. japonicum* du Japon et de Chine.

b. Sélection des patients

Afin d'évaluer les performances de la PCR *pan-Schistosoma* mise en place, des prélèvements de patients positifs avec les PCR en temps réel de routine spécifique des espèces *Sm* ou *Sh* ont été utilisés.

Ainsi, une requête sur le serveur Molis® du CHU de Toulouse a été réalisée au cours de la période allant de janvier à décembre 2020. Cent douze demandes de recherche de schistosomose *Sm* et 111 pour *Sh* ont été comptabilisées.

Seuls les prélèvements avec une PCR *Schistosoma* positive (*Sm* ou *Sh*) ont été retenus, à savoir 24 prélèvements (14 urines, 8 sérums, 1 selle et 1 sperme) de 12 patients. Les schistosomoses à *Sh* étaient les plus représentées (19/24, soit 79%) *versus* 21% de pour *Sm* (5/24).

Nous nous sommes également intéressés aux patients diagnostiqués pour une infection mixte à *Sm* et *Sh* durant la période entre 2016 et 2019. Sept sérums et 2 urines ont été retenus, provenant de 6 patients.

Dans un second temps, nous avons séquencé l'ADN parasite pour tester la capacité à faire un diagnostic d'espèce.

c. PCR en temps réel

Dans un premier temps, la PCR pan-*Schistosoma* a dû être validée en analysant les souches d'espèces connues parallèlement par PCR de routine *Sm* spécifique et *Sh* spécifique, et par PCR pan-*Schistosoma*. Les performances de cette nouvelle méthode de diagnostic ont alors pu être évaluées en comparaison à la PCR *Sm* et *Sh* spécifique. La limite de détection a été déterminée par la valeur de Ct la plus élevée avec la PCR de routine obtenant un signal positif avec la PCR pan-*Schistosoma*.

De plus, nous avons voulu rechercher l'existence éventuelle d'un lien entre la valeur du Ct obtenue, à savoir le nombre de cycles, et l'espèce détectée et entre la quantité d'ADN extraite et la valeur du Ct.

Dans un second temps, la PCR pan-*Schistosoma* a été évaluée en passant les échantillons de patients positifs à *Sm*, *Sh* ou *Sm* et *Sh*.

➤ **Extraction de l'ADN**

▪ *Souches*

Après pré-traitement par le Bacterial Lysis Buffer® et mise en suspension, l'échantillon a été homogénéisé grâce au MagnA Lyser®, ce qui a permis la libération des protéines et de l'ADN. L'extraction manuelle des acides nucléiques a été effectuée sur 200µL de surnageant en suivant les instructions du coffret High Pure PCR Template ROCHE®.

Le principe de l'extraction repose sur une lyse de cellules et une inactivation des nucléases endogènes par la protéinase K, suivie par une incubation avec un tampon qui polarise l'ADN.

Les acides nucléiques sont ensuite retenus sélectivement sur un disque en fibre de verre. Après différents lavages, un tampon d'éluion décroche l'ADN qui est utilisé en PCR.

Afin de s'affranchir de la forte concentration en ADN de schistosome et de la présence d'inhibiteurs de PCR, toutes les souches sont diluées au 1/10.

- *Echantillons de patients positifs*

Concernant les patients positifs sélectionnés, l'ADN extrait au préalable a été aliquoté et congelé à -20°C. En routine, la méthode d'extraction diffère en fonction de la nature du prélèvement.

Pour les selles, l'extraction s'effectue à partir d'une suspension de 200 µL en utilisant la méthode d'extraction manuelle du kit High Pure PCR Template ROCHE® pour obtenir un éluat de 200 µL. Pour les urines et sérums, une extraction automatisée sur le MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics®) est réalisée à partir d'1mL à l'aide du kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation (Roche Diagnostics®) pour obtenir un éluat de 50µL.

L'amplification d'un contrôle interne (le gène de la bêta globine) ou d'un contrôle externe récent (Cy5) témoigne d'une bonne extraction et de l'absence d'inhibiteurs. En absence d'amplification, le prélèvement est alors dilué au 1/4.

- **Sondes et amorces**

En routine, pour le diagnostic, l'amplification de la séquence répétée *Sm 1-7* d'une longueur de 121pb et la séquence *Dra1* de 101pb pour *Sh* est effectuée grâce au système de couple d'amorces et sondes, décrit par Cnops *et al* (89) et Hamburger *et al* (90) pour *S. haematobium* et par Wichmann *et al* pour *S. mansoni* (Tableau 4). Les sondes utilisées sont des sondes Taqman®.

Tableau 4 : Séquences des amorces et des sondes spécifiques de *Sm* et *Sh*

Espèces	Nom amorce / sonde	Séquence	Taille (pb)
<i>S. mansoni</i>	SRA1	CCA CGC TCT CGC AAA TAA TCT	21
	SRS2	CAA CCG TTC TAT GAA AAT CGT TGT	24
	SRP	FAM TCC GAA ACC ACT GGA CGG ATT TTT ATG AT TAMRA	29
<i>S. haematobium</i>	ShFw	GAT CTC ACC TAT CAG ACG AAA C	22
	ShRv	TCA CAA CGA TAC GAC CAA C	19
	Sh probe	Yellow Yakima - -TGT TGG TGG AAG TGC CTG TTT CGC AA- ECLIPSE	26

➤ **Amplification**

Pour la réalisation des 3 PCR en temps réel, la procédure du laboratoire (annexe 2) a été suivie. Seule la nature des amorces, des sondes et de la cible diffère.

Après reconstitution des amorces et des sondes, la préparation du mix a été réalisée conformément au protocole habituel ci-joint (Tableau 5) afin d'obtenir pour chaque échantillon des concentrations finales d'amorces de 0,5µM et de sonde de 0,2µM, tout cela dans un volume de 15µl. Enfin, 5µL d'ADN extrait ont été ajouté dans chaque tube patient.

Tableau 5 : Exemple de composition du mélange réactionnel PCR pan-Schistosoma

conditions de PCR:			
technique	sonde fret		
concentration finale amorce SchPanITS Fw	0,5 μ M		
concentration finale amorce SchPanITS RV	0,5 μ M		
concentration finale sonde SchPanITS Probe	0,2 μ M		
Quantité de mix	15 μ L		
Quantité ADN	5 μ L		
Réactifs	volume pour 1 mix	nbre de mix	volume à pipeter
Taq 480	10	12	120
SchPanITS Probe (20 μ M)	0,2	12	2,4
SchPanITS Fw-Rv (50 μ M-50 μ M)	0,2	12	2,4
H2O	4,6	12	55,2
	15		180

▪ *Témoins*

Un témoin H₂O permet de vérifier l'absence de contamination dans le mix.

La spécificité est testée par un témoin négatif, dilué au ¼, constitué d'ADN humain sans ADN de schistosome, provenant de patients n'ayant jamais voyagé en zone d'endémie.

Un témoin positif d'ADN de *S. mansoni* et un autre de *S. haematobium* (issus d'un pool d'échantillons positifs) sont déposés afin de pouvoir interpréter la PCR.

▪ *Programme*

L'amplification est conduite sur le LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics®) avec un programme adéquat comprenant une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C, puis d'amplification avec 45 cycles de 15 secondes de dénaturation à 95°C et 1 minute d'hybridation à 60°C. La détection de l'ADN est exprimée en valeur de Ct.

3) Séquençage

Par la suite, il semblait intéressant de séquencer le fragment d'ADN amplifié par technique de Sanger afin de différencier les espèces, voire d'identifier l'espèce en cause en le comparant à une banque de données.

La démarche a été de trouver une zone génomique commune sur laquelle pourraient s'hybrider les amorces sens et anti-sens qui entourent une région d'ADN d'environ 300 pb avec le maximum de diversité. Pour résumer, il s'agissait de choisir une région du fragment ITS spécifique d'espèce.

a. PCR matrice

Initialement, une PCR classique en point final a été réalisée sur un mix de 45µl, contenant les amorces sens SchPanITS2-FW et anti-sens SchPanITS2-RV à une concentration finale de 0,5µM, du tampon avec du MgCl₂ à 3mM et la thermostart hot start Taq polymérase (Annexe 3). La PCR matrice utilise un couple d'amorces qui délimite la séquence d'intérêt.

L'amplification a été réalisée sur le thermocycleur Veritii®, pour laquelle 3 températures d'hybridation ont pu être testées (50°C, 60°C et 65°C). Le programme comprend une dénaturation des brins à 95°C pendant 10 minutes, une étape d'amplification de 45 cycles (dénaturation durant 30 secondes à 95°C, hybridation d'une durée de 30 secondes et une élongation à 72°C durant 1 minute).

b. Révélation de la matrice

Après amplification, la PCR matrice est révélée grâce à un système d'électrophorèse capillaire automatisée LabChip® GX de CALIPER. Une séparation des fragments d'ADN amplifiés en fonction de leur longueur a alors été obtenue.

c. Réalisation de la réaction de séquence

Les 2 réactions de séquence sont effectuées dans un mix contenant une Taq polymérase, l'amorce sens ou anti-sens, des dNTPs (désoxyribonucléotides triphosphates) classiques et des ddNTPs (didésoxyribonucléotides) terminateurs de chaîne (absence de groupement OH en 3'),

marqués par un fluorophore de couleur différente. Le sens d'élongation du brin complémentaire est défini par l'amorce sens ou anti-sens, mêmes amorces que pour la PCR matrice. L'incorporation aléatoire d'un ddNTP bloque la synthèse. Avant d'être analysé sur le séquenceur ABI 3130XL, les produits obtenus doivent être purifiés afin d'éliminer les sels et les ddNTPs non incorporés.

Au final, de nombreuses séquences d'ADN de tailles variées sont produites (Figure 25).

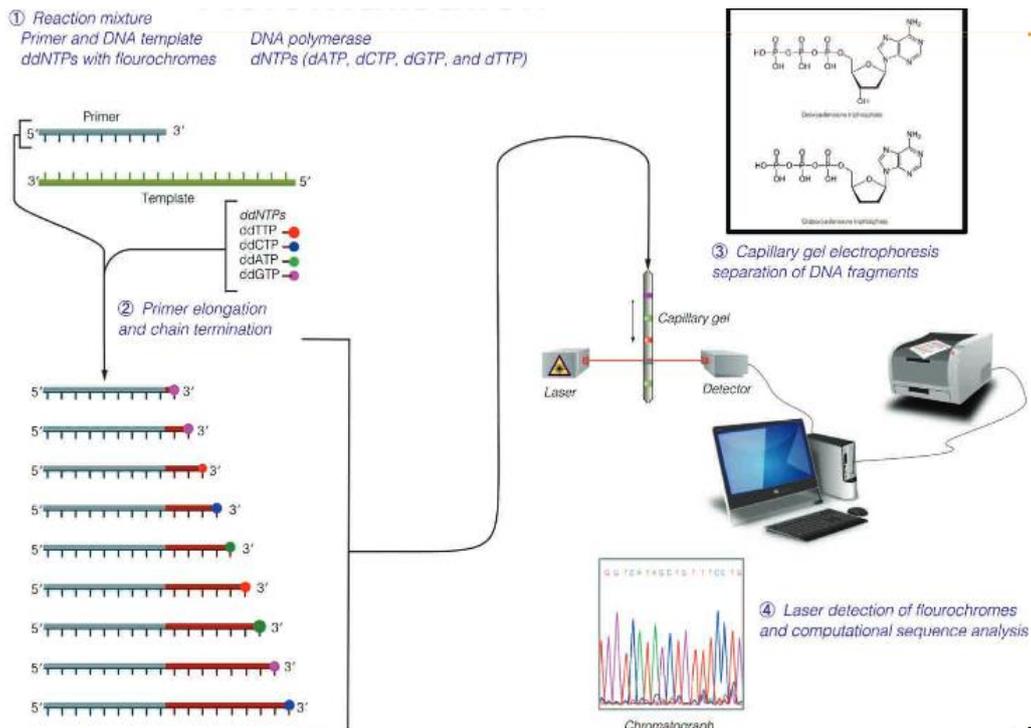


Figure 25 : Principe du séquençage (Institut d'Optique Paristech)

d. Analyse de séquences

Les séquences des brins d'ADN ont été visualisées sous forme de chromatogramme sur Chromas 2[®]. Par la suite, les deux brins sens et anti-sens ont été alignés par Bioedit Sequence Alignment Editor[®] pour former la séquence génomique complète de chaque souche.

Par ailleurs, un alignement des séquences des différentes espèces a permis d'observer les homologies et la diversité entre les espèces.

e. Comparaison à une banque de données

La comparaison avec les bases de données a été réalisée sur l'outil d'analyse de GenBank[®]: Blast[®]. L'identification d'espèce est obtenue en sélectionnant la séquence avec les meilleurs résultats en terme de recouvrement correspondant au ratio de la séquence analysée sur la séquence de référence et en terme d'homologies (similarités nucléotidiques par rapport à la séquence analysée).

III. Résultats

1) Mise en place de la PCR pan-*Schistosoma*

a. Alignement des séquences d'ADN mitochondrial

Le génome mitochondrial complet des 4 espèces principales asiatiques et africaines (*S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. mekongi*) ont été alignés.

➤ Alignement du génome des 4 espèces principales

Il n'existe pas de zone d'homologie suffisante entre *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. mekongi* pour envisager le design d'amorces et de sondes.

➤ Alignement du génome de *S. mansoni* et *S. haematobium*

Il n'existe pas non plus de zone d'homologie suffisante entre *S. mansoni* et *S. haematobium* (Figure 26).

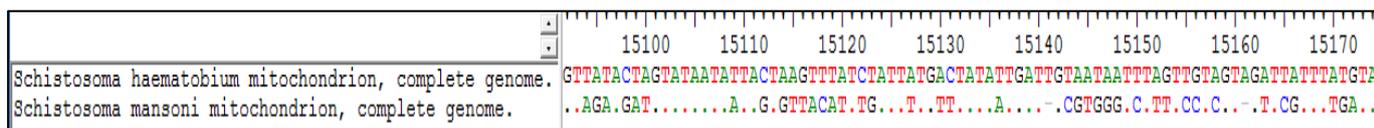


Figure 26: Exemple d'alignement partiel du génome mitochondrial complet de *S. haematobium* et *S. mansoni*

➤ Alignement du génome de *S. japonicum* et *S. mekongi*

Aucune zone d'homologies suffisante n'a été retrouvée entre *S. japonicum* et *S. mekongi* (Figure 27).

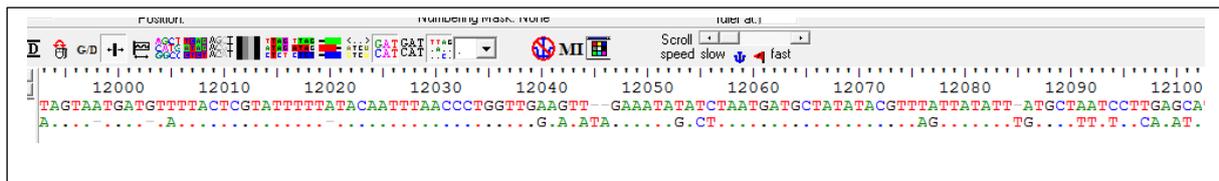


Figure 27 : Exemple d'alignement partiel du génome mitochondrial complet de *S. japonicum* et *S. mekongi*

En ciblant l'ADN mitochondrial, aucune séquence consensuelle n'a pas pu être identifiée ni entre les 4 espèces principales, ni entre les espèces asiatiques.

b. Alignement des fragments d'ADN ribosomal 18S (ITS2)

En revanche, une zone de 100% d'homologie a été retrouvée en alignant toutes les séquences ITS 2 des espèces responsables de schistosomose (Figure 29).

Ce fragment génomique d'ITS2, d'une taille d'environ 100 pb, a été alors sélectionné comme cible pour la conception d'une PCR en temps réel utilisant une sonde Taqman® afin de détecter toutes les espèces de schistosomes.

c. Choix des amorces et de la sonde

La séquence du fragment ITS commune à toutes les espèces a donc été intégrée dans Primer Express®. Ce logiciel permet de dessiner les amorces sens en 5' et anti-sens en 3', de façon à encadrer et amplifier spécifiquement la cible ITS. La sonde Taqman® est placée entre les amorces. Les séquences sont décrites dans la figure 28.

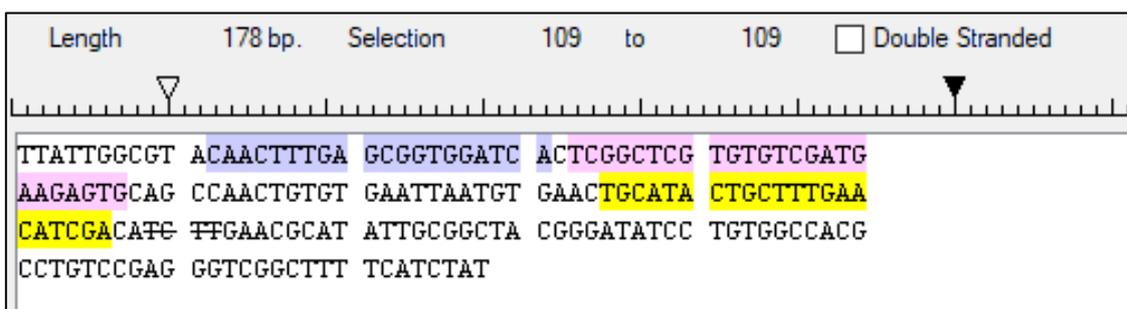


Figure 28 : Design PCR pour amplifier la cible ITS 2 (violet : amorce sens, rose : sonde, jaune : amorce anti-sens)

Une vérification de la spécificité des amorces et de la sonde a été réalisée. Leurs séquences sont positionnées dans une région totalement identique pour toutes les espèces (les séquences de *S. malayensis* et *S. intercalatum* sont considérées comme semblables) (Figure 29 : *amorce sens en bleu, sonde en violet, amorce anti-sens en vert*).

On s'est aussi assuré que ces oligonucléotides ne s'appariaient pas avec l'ADN humain et d'autres parasites et champignons (*Ascaris lombricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Fasciola hepatica*, *Plasmodium sp.*, *Toxoplasma sp.*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*).

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
S.mansoni   TTAGTTCTAT GCATTTGGGT AACCGATGTA TGGGATTATT GGCGTACAAC
S.rodhaini  TTAGTTCTAT GCATTTGGGT AACCGATGTA TGGGATTATT GGCGTACAAC
S.haematob  TTAGTTCTAT GCATTTGGGA AACCAATGTA TGGGATTATT GGCGTACAAC
S.mattheei  TTAGTTCTAT GCATTTGGGA AACCAATGTA TGGGATTATT GGCGTACAAC
S.haexS.b   TTAGTTCTAT GCATTTGGGA AACCAATGTA TGGGATTATT GGCGTACAAC
S.bovis     TTAGTTCTAT GCATTTGGGA AACCAATGTA TGGGATTATT GGCGTACAAC
S.guineens  TTAGTTCTAT GCATTTGGGA AACCAATGTA TGGGATTATT GGCGTACAAC
S.intercal  -----
S.japonicu  TTAGTTCTAT GCACTTTG-- -----TGTA TAGAGTTATT GGCGTACAAC
S.mekongi   TTAGTTCTAT GCACTACACT -----GTGTA TAGGGTTATT GGTGTACAAC
S.mekongi   ~~~~~~
S.malayens  -----
S.malayens  TTAGTTC... ..
Pan schist  ~~~~~~ CAAC
sonde pan   ~~~~~~
Pan schist  ~~~~~~

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510          520          530          540          550
S.mansoni   TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.rodhaini  TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.haematob  TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.mattheei  TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.haexS.b   TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.bovis     TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.guineens  TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.intercal  -----
S.japonicu  TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.mekongi   TTTGAGCGGT GGATCACTCG GCTCGTGTGT CGATGAAGAG TGCAGCCAAC
S.mekongi   ~~~~~~
S.malayens  -----
S.malayens  .....
Pan schist  TTTGAGCGGT GGATCA... ..
sonde pan   ~~~~~~ TCG GTCCGTGTGT CGATGAAGAG TG.....
Pan schist  ~~~~~~

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560          570          580          590          600
S.mansoni TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.rodhaini TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.haematob TGTGTGAATT AATGTGAACT GYATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.mattheei TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.haexS.b TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.bovis TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.guineens TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.intercal -----
S.japonicu TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.mekongi TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.mekongi ~~~~~
S.malayens -----
S.malayens .....
Pan schist .....
sonde pan .....
Pan schist ~~~~~T GCATACTGCT TTGAACATCG A~~~~

```

Figure 29 : Alignement partiel des séquences ITS de toutes les espèces de *Schistosoma* avec amorces et sonde

2) Validation de la PCR pan-*Schistosoma*

a. Validation de la PCR pan-*Schistosoma* sur l'ADN des différentes espèces

La PCR pan-*Schistosoma* a détecté toutes les espèces avec un nombre de Ct faible (Figures 30 et 31). Nous avons obtenu de belles courbes d'amplification, avec une réelle phase exponentielle. L'ADN humain (témoin négatif) n'a pas été détecté.

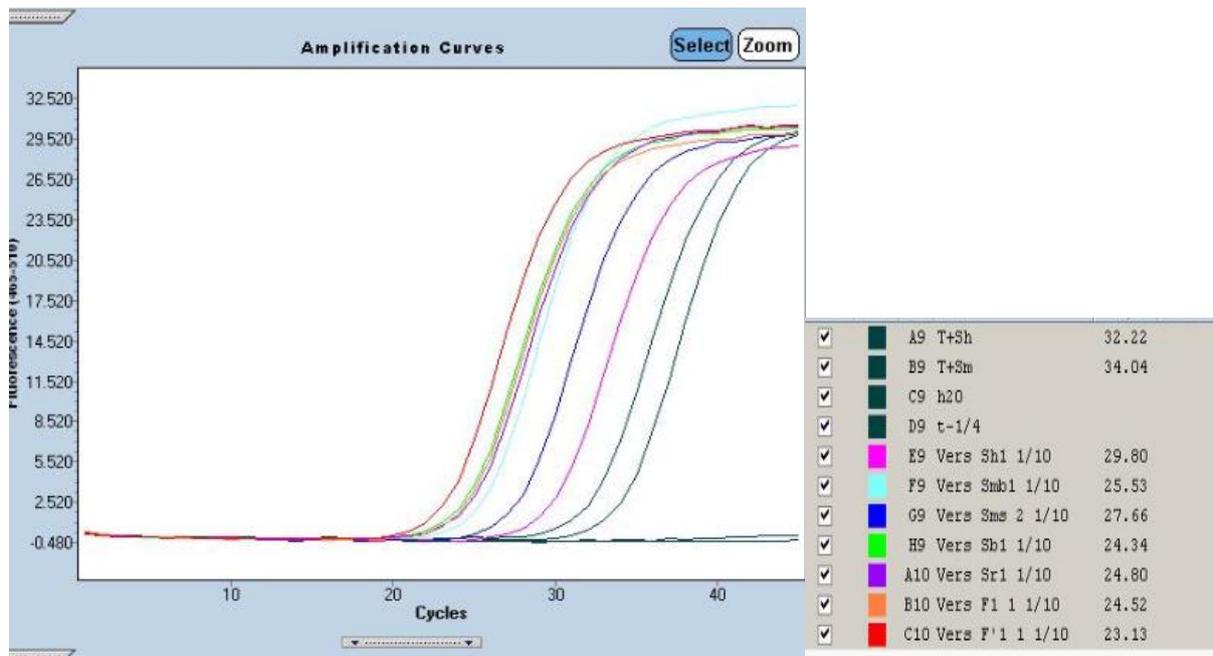


Figure 30 : Courbes d'amplification obtenues avec la PCR pan-Schistosoma (espèces africaines) avec en abscisse le nombre de cycles et en ordonnées la fluorescence mesurée

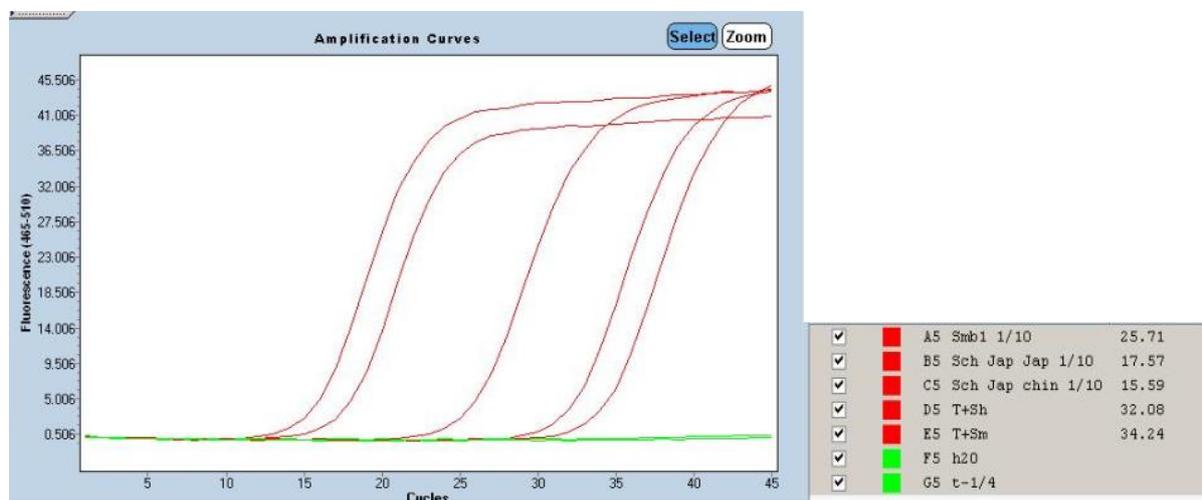


Figure 31: Courbes d'amplification obtenues avec la PCR pan-Schistosoma (espèces asiatiques)

b. Comparaison des performances de la PCR pan-Schistosoma avec nos PCR *S. mansoni* et *S. haematobium* utilisées dans le service

Les 22 échantillons de 9 souches différentes ont été testés à la fois sur PCR pan-*Schistosoma* et sur PCR de routine *S. mansoni* et *S. haematobium*. Les résultats sont donnés dans le tableau 6 et sont exprimés en nombre de cycles de PCR (Ct). Les ΔCt correspondent à la différence de Ct entre la PCR pan-*Schistosoma* et la PCR de routine *Sh* ou *Sm* selon le groupe d'espèce. Pour *S. japonicum*, le ΔCt le plus élevé a été retenu.

Il est ainsi possible de comparer la PCR pan-*Schistosoma* et les PCR de routine en terme de sensibilité et d'estimer le lien entre la valeur du Ct et l'espèce détectée ou entre le nombre de cycles obtenus sur PCR pan-*Schistosoma* et la quantité d'ADN extrait.

Tableau 6: Résultats de la PCR pan-*Schistosoma* et PCR de routine *Sm* et *Sh* des souches d'espèce connue (ND : non détectable, NF : non fait)

	Ct PCR pan	Ct PCR Sh	Ct PCR Sm	ΔCt spé
T- 1/4	ND	ND	ND	ND
T+ Sh	32,22	25,69	NF	6,53
T+Sm	34,2	NF	28,7	5,5
Sh1	29,8	23,68	ND	6,12
Sh2	26,95	19,83	ND	7,12
Sh3	31,98	24,69	36	7,29
SmB1	25,53	37,32	17,55	7,98
SmB2	32,63	29,97	26,11	6,52
SmB3	24,33	33,64	17,68	6,65
SmS2	27,66	37,6	21,74	5,92
SmS3	28,15	35,73	22,13	6,02
Sb1	24,34	18,56	36,81	5,78
Sb2	28,57	22,52	33,25	6,05
Sb3	25,29	18,88	33,69	6,41
Sr1	24,8	37,19	20,91	3,89
Sr2	25,14	37,65	21,13	4,01
Sr3	30,17	36,1	26,18	3,99
F1 1	24,52	18,49	ND	6,03
F1 2	22,91	16,57	ND	6,34
F1 3	23,67	16,95	40	6,72
F1' 1	23,13	16,95	ND	6,18
F1' 2	22,73	16,43	39,19	6,3
F1' 3	23,66	16,75	ND	6,91
Sj Ch	15,59	29,25	26,77	-13,66
Sj Jap	17,57	29,3	27,49	-11,73

La PCR pan-*Schistosoma* est moins sensible que les PCR de routine. Les témoins positifs propres à chaque espèce *Sm* ou *Sh* se positivent plus tardivement que sur la PCR de routine, avec un ΔCt de 6,53 cycles pour *Sh* et 5,5 cycles pour *Sm*.

Pour le complexe *S. haematobium*, une corrélation existe entre les valeurs de Ct de la PCR pan-*Schistosoma* et la PCR de routine *Sh* avec un R^2 égal à 0,9765, de même que pour la PCR de routine *Sm* pour le complexe *S. mansoni* (figure 32 et 33).

Ceci démontre que la sensibilité de la PCR pan-*Schistosoma* est la même quelle que soit l'espèce, pour les complexes *haematobium* et *mansoni*.

Cette corrélation montre que la différence de Ct observée entre les espèces avec la PCR pan-*Schistosoma* est majoritairement expliquée par la variation de quantité d'ADN extrait.

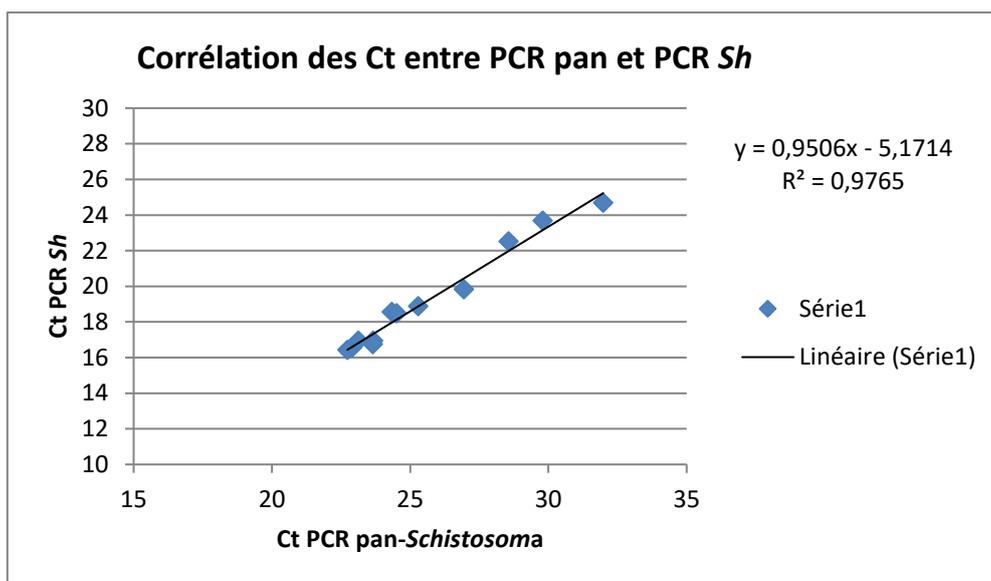


Figure 32 : Corrélation entre les Ct de la PCR pan et de la PCR spécifique *Sh*

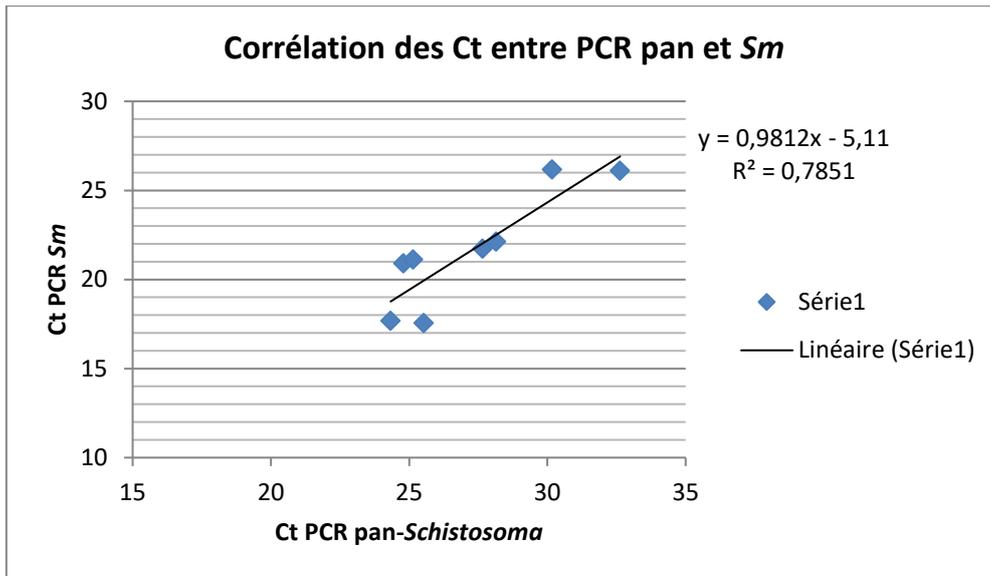


Figure 33: Corrélation entre les Ct de la PCR pan et de la PCR spécifique Sm

3) Identification des amplicons par séquençage

L'intérêt du séquençage est de pouvoir identifier les souches asiatiques des souches africaines.

a. Design des amorces du séquençage

L'alignement des séquences ITS des espèces de *S. mansoni*, *S. rhodaini*, *S. haematobium*, *S. mattheii*, *S. guineensis*, *S. haematobium x S. bovis*, *S. bovis*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. malayensis* a permis de mettre en évidence une zone commune sur laquelle les amorces sens (Fw) et anti-sens (Rv) s'hybrident spécifiquement mais qui encadre une zone avec des différences nucléotidiques (Figure 34).

	510	520	530	540	550
S. mansoni	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. rodhaini	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. haematob	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. mattheii	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. haexS.b	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. bovis	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. guineensis	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. intercal	-----	-----	-----	-----	-----
S. japonicu	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. mekongi1	TTTGAGCGGT	GGATCACTCG	GCTCGTGTGT	CGATGAAGAG	TGCAGCCAAC
S. mekongi2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
S. malayens	-----	-----	-----	-----	-----
S. malayens
Fw	-----	-----	-----	-----	-----
Rv	-----	-----	-----	-----	-----

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      560      570      580      590      600
S.mansoni   TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.rodhaini  TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.haematob  TGTGTGAATT AATGTGAACT GYATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.mattheei  TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.haexS.b   TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.bovis    TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.guineens TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.intercal  -----
S.japonicu  TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.mekongi1  TGTGTGAATT AATGTGAACT GCATACTGCT TTGAACATCG ACATCTTGAA
S.mekongi2  ~~~~~
S.malayens  -----
S.malayens  .....
Fw         TGTGT-----
Rv         -----

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      610      620      630      640      650
S.mansoni   CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.rodhaini  CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.haematob  CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.mattheei  CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.haexS.b   CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.bovis    CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.guineens CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.intercal  ----- --GAGGGTGC
S.japonicu  CGCATATTGC GGCTACGGGA TATCCTGTGG CCACGCCTGT CCGAGGGTGC
S.mekongi1  CGCAT-----
S.mekongi2  ~~~~~ ---AGGGTGC
S.malayens  ~~~~~ -CCTGT CCGAGGGTGC
S.malayens  .....
Fw         -----
Rv         -----

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      660      670      680      690      700
S.mansoni   GCTTTTCATC TATCAXCGAC GCACATTAAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.rodhaini  GCTTTTCATC TATCAXCGAC GCACATTAAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.haematob  GCTTTTCATC TATCAXCGGC GCACATTGAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.mattheei  GCTTTTCATC TATCAXCGGC GCACATTGAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.haexS.b   GCTTTTCATC TATCAXCGGC GCACATTGAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.bovis    GCTTTTCATC TATCAXCGGC GCACATTGAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.guineens GCTTTTCATC TATCAXCGGC GCACATTGAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.intercal  GCTTTTCATC TATCAXCGGC GCACATTGAX GTCGTGGATT GGGCGAGTGC
S.japonicu  GCTTTTCATC TATCAXCGAC GCACATTAAX GTCGTGGATT GGCCGAGTGC
S.mekongi1  -----
S.mekongi2  GCTTTTCATC TATCAXCGAC GCACATTAAX GTCGTGGATT GGCCGAGTGC
S.malayens  CCTTTTCATC TATCCCCGAC GCACATTAAX GTCGTGGATT GCCCGAGTGC
S.malayens  .....
Fw         -----
Rv         -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
S.mansoni      CTGCCGGCGT TT-----AAA CCCGTATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.rodhaini    CTGCCGGCGT TT-----AAA CCCGTATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.haematob   CTGCCGGCGT GT-----ATA CCCGCATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.mattheei   CTGCCGGCGT GT-----ATA CCCGCATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.haexS.b    CTGCCGGCGT GT-----ATA CCCGCATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.bovis      CTGCCGGCGT GT-----ATA CCCGCATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.guineens  CTGCCGGCGT GT-----ATA CCCGCATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.intercal  GTGCCGGCGT GT-----ATA CCCGCATATC --XAACGCGG GTTGCTG---
S.japonicu  CTGCCGGCAT  GTTTGATGCG CTCGTATATA TGXAATGCGG GTTGCTGCTG
S.mekongi1  -----
S.mekongi2  CTGCCGGCAT  ATATTTGATG CGCTCGTGTA TCXAACGCGG GTTGCTGCTG
S.malayens  CTGCCGGCAT  ATATTTGATG CGCTCGTGTA TCCAACGCGG GTTGCTGCTG
S.malayens  .....
Fw         -----
Rv         -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770          780          790          800
S.mansoni      GTCAGAGGCT CCGTCCTAAT AATCCGGCCA -CAGCCTAGT CTGGTCTAGA
S.rodhaini    GTCAGAGGCT CCGTCCTAAT AATCCGGCCA -CAGCCTAGT CTGGTCTAGA
S.haematob   GTCGAAGGCT CCGTCCTAAT AGTCCGGCCA -CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.mattheei   GTCAAAGGCT CCGTCCTAAT AGTCCGGCCA -CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.haexS.b    GTCAAAGGCT CCGTCCTAAT AGTCCGGCCA -CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.bovis      GTCAAAGGCT CCGTCCTAAT AGTCCGGCCA -CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.guineens  GTCAAAGGCT CCGTCCTAAT AGTCCGGCCA ACAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.intercal  GTCAAAGGCT CCGTCCTAAT AGTCCGGCCA -CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.japonicu  GTCAAAGGCT CCGTCCGAAT AATCCGACCA -CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.mekongi1  -----
S.mekongi2  GTCAAAGGCT CCGTCCGAAA AATCCGATCA ~CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.malayens  GTCAAAGGCT CCGTCCGAAA AATCCGATCA ~CAGCCTAGT CCGGTCTAGA
S.malayens  .....
Fw         -----
Rv         -----

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810          820          830          840          850
S.mansoni      TGACTTGATT GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.rodhaini    TGACTTGATT GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.haematob   TGACTTGATC GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.mattheei   TGACTTGATT GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.haexS.b    TGACTTGATT GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.bovis      TGACTTGATT GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.guineens  TGACTTGATT GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.intercal  TGACTTGATT GAGATGCTGC GGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.japonicu  TAGCCAGATT AAGATGCTGC AGTGGGTTGT GCTCGAGTCA TGGCTTAATG
S.mekongi1  -----
S.mekongi2  TAACCAGATT GAGATGCTGC AGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.malayens  TAACCAGATT GAGATGCTGC AGTGGGTTGT GCTCGAGTCG TGGCTTAATG
S.malayens  .....
Fw         -----
Rv         -----

```

Figure 34: Alignement des séquences pour le design des amorces du séquençage

b. Produits de la PCR matrice à séquencer

Avec une température d'hybridation à 60°C, la PCR matrice a permis d'obtenir un amplicon pour chaque souche, révélé sous forme d'une seule bande d'ADN d'une longueur de 300pb après séparation électrophorétique (Figure 35). Aucun signal n'a été détecté pour le témoin H₂O. Ces amplicons vont pouvoir être séquencés et analysés afin d'identifier l'espèce.

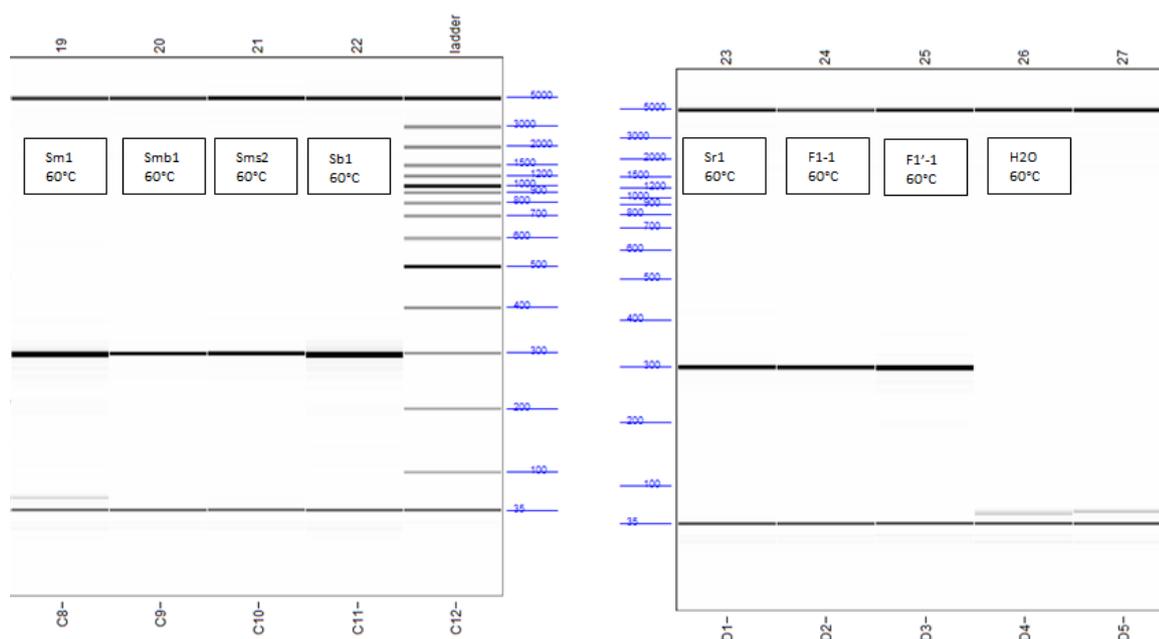


Figure 35 : Electrophorèse capillaire des fragments à séquencer

c. Analyse des séquences nucléotidiques

La séquence génomique, résultant de l'incorporation nucléotidique, est visualisée sous forme de chromatogrammes (Figures 36 et 37). Par la suite, l'alignement des 2 brins sens et anti-sens a permis de construire la séquence complète du fragment (Figure 38). Cette dernière est alors comparée à la base de données, permettant ainsi l'identification de l'espèce. Pour toutes les espèces étudiées, un taux de recouvrement de 100% est obtenu (Figure 39). Cependant, la séquence ITS choisie ne permet pas de faire la distinction entre les espèces apparentées du même groupe (par exemple entre *S. rhodaini* et *S. mansoni*).

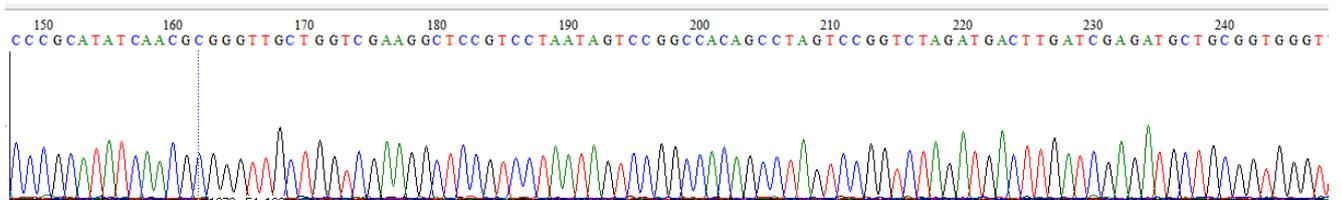


Figure 36 : Exemple de chromatogramme - brin sens de l'espèce *Sh* (Chromas®)

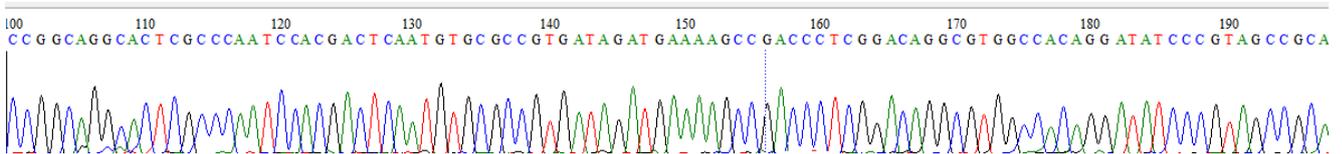


Figure 37 : Exemple de chromatogramme - brins anti-sens *Sh* (Chromas®)

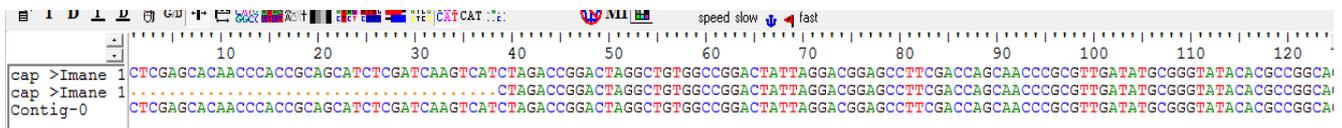


Figure 38 : Alignement des 2 brins et résultat de la séquence complète du fragment amplifié

Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Schistosoma mansoni voucher X2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	Schistosoma mansoni	507	507	100%	2e-139	99.64%	903	MF7765!
Schistosoma mansoni isolate Ivory Coast internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	Schistosoma mansoni	507	507	100%	2e-139	99.64%	902	MG5546
Schistosoma mansoni 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Schistosoma mansoni	507	507	100%	2e-139	99.64%	955	KX0110:
Schistosoma mansoni 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Schistosoma mansoni	507	507	100%	2e-139	99.64%	955	KX0110:
Schistosoma mansoni isolate ITSd1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Schistosoma mansoni	507	507	100%	2e-139	99.64%	915	JQ2897!
Schistosoma mansoni isolate ITSd1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Schistosoma mansoni	507	507	100%	2e-139	99.64%	915	JQ2897!

Figure 39 : Comparaison à la banque de données GenBank®

L'alignement du fragment séquencé ITS de toutes espèces confondues a permis de différencier les souches asiatiques des souches africaines. De même, il est possible de discriminer les souches du complexe *S. mansoni* et l'espèce animale *S. bovis*. Les nucléotides différents pour les souches asiatiques sont surlignés en rouge, pour *S. bovis* en bleu, pour les

espèces du complexe *Sm* en vert et en jaune les mutations hétérozygotes des hybrides *S. haematobium* x *S. bovis* (figure 40).

	10	20	30	40	50
S. haemato	-CCAATGTGT	GAATTAATGT	GAACTGCATA	CTGCTTTGAA	CATCGACATC
S. japonic	-----	-----	-----	-----TGA	CATCGACATC
F1 S. bovi	----CTGTGT	GAATTAATGT	GAACTGCATA	CTGCTTTGAA	CATCGACATC
F1' S. bov	-CAACTGTGT	GAATTAATGT	GAACTGCATA	CTGCTTTGAA	CATCGACATC
S. bovis	----CTGTGT	GAATTAATGT	GAACTGCATA	CTGCTTTGAA	CATCGACATC
Sm Brésil	CCATCTGTGT	GAATTAATGT	GAACTGCATA	CTGCTTTGAA	CATCGACATC
S. rhodain	-----TGTGT	GAATTAATGT	GAACTGCATA	CTGCTTTGAA	CATCGACATC
Sm Sénégal	----CTGTGT	GAATTAATGT	GAACTGCATA	CTGCTTTGAA	CATCGACATC

	60	70	80	90	100
S. haemato	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG
S. japonic	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG
F1 S. bovi	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG
F1' S. bov	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG
S. bovis	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG
Sm Brésil	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG
S. rhodain	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG
Sm Sénégal	TTGAACGCAT	ATTGCGGCTA	CGGGATATCC	TGTGGCCACG	CCTGTCCGAG

	110	120	130	140	150
S. haemato	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGGCGCACAT	TGAGTCGTGG	ATTGGGCGAG
S. japonic	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGACGCACAT	TAAGTCGTGG	ATTGGGCGAG
F1 S. bovi	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGGCGCACAT	TGAGTCGTGG	ATTGGGCGAG
F1' S. bov	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGGCGCACAT	TGAGTCGTGG	ATTGGGCGAG
S. bovis	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGGCGCACAT	TGAGTCGTGG	ATTGGGCGAG
Sm Brésil	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGACGCACAT	TAAGTCGTGG	ATTGGGCGAG
S. rhodain	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGACGCACAT	TAAGTCGTGG	ATTGGGCGAG
Sm Sénégal	GGTCGGCTTT	TCATCTATCA	CGACGCACAT	TAAGTCGTGG	ATTGGGCGAG

	160	170	180	190	200
S. haemato	TGCCTGCCGG	CGTGTATA--	-----CCCGC	ATATCAACGC	GGGTTGCTG-
S. japonic	TGCCTGCCGG	ATGTATTGAT	GCGCTCGTAT	ATATCAATGC	GGGTTGCTG-
F1 S. bovi	TGCCTGCCGG	CGTGTATA--	-----CCCGC	ATATCAACGC	GGGTTGCTG-
F1' S. bov	TGCCTGCCGG	CGTGTATA--	-----CCCGC	ATATCAACGC	GGGTTGCTG-
S. bovis	TGCCTGCCGG	CGTGTATA--	-----CCCGC	ATATCAACGC	GGGTTGCTG-
Sm Brésil	TGCCTGCCGG	CGTGTATA--	-----CCCGT	ATATCAACGC	GGGTTGCTG-
S. rhodain	TGCCTGCCGG	CGTGTATA--	-----CCCGT	ATATCAACGC	GGGTTGCTG-
Sm Sénégal	TGCCTGCCGG	CGTGTATA--	-----CCCGT	ATATCAACGC	GGGTTGCTG-

	210	220	230	240	250
S. haemato	--GTCGAAGG	CTCCGTCCCTA	ATAGTCCGGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG
S. japonic	TGCTCAAAGG	CTCCGTCCCA	ATAATCCGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG
F1 S. bovi	--GTCRAAGG	CTCCGTCCCTA	ATAGTCCGGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG
F1' S. bov	--GTCRAAGG	CTCCGTCCCTA	ATAGTCCGGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG
S. bovis	--GTCRAAGG	CTCCGTCCCTA	ATAGTCCGGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG
Sm Brésil	--GTCAGAGG	CTCCGTCCCTA	ATAATCCGGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG
S. rhodain	--GTCAGAGG	CTCCGTCCCTA	ATAATCCGGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG
Sm Sénégal	--GTCAGAGG	CTCCGTCCCTA	ATAATCCGGC	CACAGCCTAG	TCCGGTCTAG

	260 270 280 290 300
S. haemato	ATGACTTGAT CGAGATGCTG CGGTGGGTTG TGCTCGAG-- -----
S. japonic	ATAGCCAAGAT TAAGATGCTG CAAGTGGGTTG TGCTCGAGTC GTGGCTTAAA
F1 S. bovi	ATGACTTGAT YGAGATGCTG CGGTGGGTTG TGCTCGAG-- -----
F1' S. bov	ATGACTTGAT YGAGATGCTG CGGTGGGTTG TGCTCGA--- -----
S. bovis	ATGACTTGAT TGAGATGCTG CGGTGGGTTG TGCTCGA--- -----
Sm Brésil	ATGACTTGAT TGAGATGCTG CGGTGGGTTG TGCTCGA--- -----
S. rhodain	ATGACTTGAT TGAGATGCTG CGGTGGGTTG TGCTCGAGTC -----
Sm Sénégal	ATGACTTGAT TGAGATGCTG CGGTGGGTTG TGCTCGA--- -----

Figure 40 : Alignement des séquences et les différences nucléotidiques entre espèces

4) Applications des méthodes de détection moléculaire pan-*Schistosoma*

a. Amplification des échantillons positifs en routine avec PCR pan-*Schistosoma*

Au total, 33 prélèvements de 18 patients positifs ont été analysés en utilisant la PCR pan-*Schistosoma*. L'idée est de comparer les sensibilités respectives des PCR. Les valeurs des Ct sont relevées dans le tableau 8.

Tableau 7: Nombre de cycles de PCR obtenus avec la PCR pan-*Schistosoma* pour les échantillons positifs en PCR en temps réel *Sh* ou *Sm* spécifique

	Nature prélèvement	Espèce	Ct (PCR Sm ou Sh)	Ct (PCR pan ITS)	ΔCt
1	sérum	<i>Sm</i>	31,91	40	8,09
2	sérum	<i>Sm</i>	33,91	38,73	4,82
3	selles	<i>Sm</i>	18,23	27,57	9,34
4	sérum	<i>Sm</i>	33,4	ND	NF
5	sérum	<i>Sm</i>	35,23	ND	NF
6	urines	<i>Sh</i>	34,09	ND	NF
7	urines	<i>Sh</i>	19,79	27,33	7,54
8	urines	<i>Sh</i>	17,17	24,49	7,32
9	sérum	<i>Sh</i>	32,73	ND	NF
10	urines	<i>Sh</i>	31,03	ND	NF
11	urines	<i>Sh</i>	23,51	30,9	7,39
12	urines	<i>Sh</i>	35,72	ND	NF
13	urines	<i>Sh</i>	26,47	33,9	7,43
14	sérum	<i>Sh</i>	40	ND	NF
15	sérum	<i>Sh</i>	38,25	ND	NF
16	urines	<i>Sh</i>	32,28	ND	NF
17	urines	<i>Sh</i>	20,8	27,83	7,03
18	urines	<i>Sh</i>	20,54	27,03	6,49
19	urines	<i>Sh</i>	18,72	26,06	7,34
20	urines	<i>Sh</i>	> 40	ND	NF
21	sperme	<i>Sh</i>	40	ND	NF
22	urines	<i>Sh</i>	37,98	ND	NF
23	urines	<i>Sh</i>	28,94	37,35	8,41
24	sérum	<i>Sh</i>	37,93	ND	NF
25	sérum	<i>Sh/Sm</i>	34.69/34.71	ND	NF
26	sérum	<i>Sh/Sm</i>	36.06/31.59	ND	NF
27	sérum	<i>Sh/Sm</i>	39.03/35.12	ND	NF
28	sérum	<i>Sh/Sm</i>	32.18/37.85	40	7,82
29	sérum	<i>Sh/Sm</i>	35.59/31.53	38,49	6,96
30	sérum	<i>Sh/Sm</i>	38.81/30.77	37,36	6,59
31	sérum	<i>Sh/Sm</i>	30.17/31.72	39,19	9,02
32	urines	<i>Sh/Sm</i>	20.67/21.53	27,76	7,09
33	urines	<i>Sh/Sm</i>	17.25/18.38	23,2	5,95

Globalement, la PCR pan-*Schistosoma* a détecté 51,5% (17/33) des échantillons positifs.

Une sensibilité de 60% (3/5) est obtenue pour les diagnostics de *Sm*, 42,1% (8/19) pour *Sh* et 67% pour les infections mixtes à *Sm* et *Sh*.

La sensibilité s'élève à 64,7% dans les excréta et 40% dans le sérum.

La limite de détection de la PCR pan-*Schistosoma* par rapport aux PCR de routine est de 33,4 cycles pour *Sm* et 31,03 cycles pour *Sh*.

b. Analyse de séquence d'un échantillon de patient co-infecté *S. mansoni* et *S. haematobium*

L'analyse de séquence du fragment ITS de l'échantillon n°33 positif à la fois à *S. mansoni* (Ct de 18,38) et à *S. haematobium* (Ct de 17,25) retrouvé dans une matrice urine semble identifier

un hybride *S. mansoni* x *S. haematobium*, même si ce n'est pas une preuve absolue (Figure 41). Une infection par les deux espèces avec la même charge pourrait théoriquement donner un résultat identique.

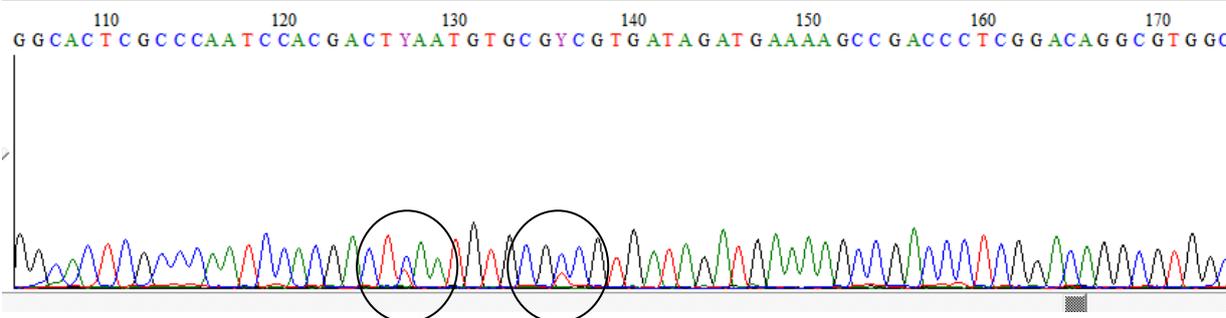


Figure 41: Chromatogramme d'une partie de séquence du brins sens - présence de mutations hétérozygotes

IV. Discussion

Face à l'abandon de la microscopie, du fait du manque de sensibilité et de la nécessité d'expertise des opérateurs, il nous a semblé intéressant de développer des outils de biologie moléculaire permettant le diagnostic de toutes les espèces de schistosomes, y compris de celles dont la prévalence est faible.

A ce jour, les PCR décrites dans la littérature (Cnops *et al* (89), Guo *et al* (91), Pontes *et al* (79)) ciblent majoritairement une ou deux espèces. De même, les PCR de routine utilisées au CHU de Toulouse permettent la détection spécifique de *S. mansoni* ou *S. haematobium*.

Toutefois, en 2008, Obeng *et al* (72) ont développé une PCR ITS2 qui détecte *S. mansoni* et *S. haematobium* sans différenciation. Puis, Cnops *et al* (87), en 2012, ont utilisé l'ARN 28S comme cible d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* et *S. bovis*. Cette technique a permis la détection du parasite dans la totalité des excréta avec un EPS/EPU positif, et a même contribué à l'amélioration de la sensibilité. En revanche, la sensibilité est moins bonne dans le sérum.

Dans cette étude, nous avons opté pour une PCR en temps réel en raison de son faible risque de contamination, sa rapidité, sa haute sensibilité et sa capacité de quantification.

Le design d'une seule paire d'amorces et d'une sonde parfaitement spécifiques de 11 espèces différentes est un des points forts de cette étude. La PCR pan-*Schistosoma* ciblant ITS2 a pu ainsi détecter toutes les souches parasitaires testées.

Les espèces animales ont également été ciblées et détectées. Cela peut présenter un intérêt épidémiologique, d'autant plus que nous assistons à l'émergence d'hybrides entre souches animales et humaines.

La PCR pan-*Schistosoma* relève d'une bonne spécificité. Elle est évaluée par l'absence d'amplification d'ADN humain (témoin négatif). *In silico*, aucune réaction croisée n'a été obtenue avec les autres parasites intestinaux et sanguins. En revanche, nous ne l'avons pas testé en pratique.

La PCR pan-*Schistosoma* est moins sensible que les PCR spécifiques de routine. Au total, la sensibilité analytique s'élève à 51%. Elle est meilleure dans les excréta (64%) que dans le sérum (40%). La limite de détection de 33,4 cycles pour *Sm* et 31,03 cycles pour *Sh* reste correcte, mais est un des facteurs limitants.

Dans ce travail, l'objectif premier était d'avoir à disposition dans le Service de Parasitologie-Mycoologie du CHU de Toulouse une PCR pan-*Schistosoma* de recours, en complément de nos PCR de routine.

Cette moindre sensibilité est expliquée par le choix d'une cible non retrouvée en multi-copies dans le génome. En revanche, ce gène décrit des performances intéressantes. La PCR ciblée sur ITS2, développée par Obeng *et al* (72), a présenté une bonne sensibilité de détection (89%) des espèces *S. mansoni* et *S. haematobium*, par comparaison aux techniques optiques.

Une étude de comparaison des performances de la PCR pan-*Schistosoma* par rapport à la microscopie devrait être envisagée à l'avenir.

La sensibilité de la PCR pan-*Schistosoma* est la même quelle que soit l'espèce. Les différences de détection de chaque souche s'expliquent uniquement par une quantité d'ADN différente.

Le séquençage des fragments ITS2 a permis de faire la distinction entre les souches africaines et les souches asiatiques. Il a été également possible de différencier le complexe *S. haematobium* du complexe *S. mansoni* et d'identifier certaines espèces hybrides. En revanche, nous n'avons pas réussi à distinguer *S. mansoni* de la souche animale *S. rhodaini*, mais il n'y a aucun impact clinique.

L'analyse de séquence d'un des échantillons doublement positifs sur PCR *Sh* et *Sm* de routine semble identifier un hybride *S. mansoni* x *S. haematobium*. Ce résultat est concordant avec la détection de l'ADN des 2 espèces dans les urines, mais nous ne pouvons l'affirmer complètement.

Devant la découverte de la multiplicité d'espèces hybrides de *Schistosoma sp.* et leur importance en pathologie humaine, il apparaît important de disposer d'un outil de diagnostic pan-*Schistosoma*.

Conclusion et perspectives

Face à l'abandon inéluctable de la microscopie dans les prochaines années, des outils de diagnostics moléculaires sensibles et spécifiques doivent être développés pour diagnostiquer des schistosomoses, deuxième parasitose d'importation en France.

Dans cette étude, la mise en place de la PCR basée sur ITS a permis la détection de toutes les espèces de schistosomes. Cette PCR pan-*Schistosoma* semble détecter toutes les espèces avec la même sensibilité.

Au point de vue épidémiologique, une identification d'espèce a été obtenue par séquençage du fragment ITS. Ce dernier a permis de différencier les souches asiatiques des souches africaines ainsi que certains hybrides.

Ce travail a permis d'avoir à disposition dans le Service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse, une PCR de recours à la PCR de routine spécifique à *S. mansoni* et à *S. haematobium*. Face à des signes cliniques évocateurs au retour d'une zone d'endémie et d'une PCR *S. haematobium* et *S. mansoni* négative, l'utilisation de la PCR pan-*Schistosoma* développée pourra avoir son intérêt.

ANNEXES

Annexe 1 : Etats des lieux des cibles utilisées pour le sérodiagnostic et en biologie moléculaire (17)

TABLE 1 Parasite-derived biomolecules and their application in the immunological diagnosis of human schistosomiasis

Antigenic target (life cycle stage)	Diagnostic approach	Parasite	Application of the test with human sample
Soluble egg antigens	ELISA—antibody detection in serum	<i>S. mansoni</i>	Yes
	ELISA—detection of specific IgG4 reactivity in serum		Yes
	ELISA—antibody detection in saliva	<i>S. mansoni</i>	Yes
		<i>S. japonicum</i>	Yes
	ELISA—circulating antigen detection in serum by using IgY isolated from egg yolk	<i>S. japonicum</i>	Yes
	Detection of antibodies by magnetic affinity enzyme-linked immunoassay (MEIA), using serum	<i>S. japonicum</i>	Yes
	Detection of antibodies by dot immunogold filtration assay (DIGFA), using serum		Yes
	Detection of antibodies by dipstick with latex immunochromatographic assay (DLIA), using serum		Yes
	Detection of antibodies by colloidal dye immunofiltration assay (CDIFA), using serum		Yes
	Detection of antibodies by dipstick dye immunoassay (DDIA), using serum		Yes
	Detection of antibodies by up-converting phosphor reporter (UCP-LF) rapid diagnostic kit, using serum	<i>S. mansoni</i>	No
Cercarial antigens	ELISA—antibody detection in serum	<i>S. mansoni</i>	Yes
	Detection of antibodies by UCP-LF rapid diagnostic kit, using serum		No
Adult worm antigens	ELISA—antibody detection in serum	<i>S. mansoni</i>	Yes
	ELISA—antibody detection in urine	<i>S. mansoni</i>	Yes
		<i>S. haematobium</i>	Yes
	Detection of antibodies by silver-enhanced colloidal gold metallo-immunoassay, using serum	<i>S. japonicum</i>	No
Adult worm microsomal antigen	ELISA—antibody detection in serum	<i>S. mansoni</i>	Yes
		<i>S. japonicum</i>	Yes
	Detection of antibodies by Falcon assay screening test (FAST) ELISA, using serum	<i>S. mansoni</i>	Yes
	Detection of antibodies in serum by FAST ELISA and immunoelectrotransfer blot (EITB)	<i>S. haematobium</i> <i>S. haematobium</i>	Yes Yes
Components of soluble egg antigens	ELISA—specific antibody detection in serum	<i>S. japonicum</i>	Yes
Cationic fraction 6 antigen CEF-6 (egg)		<i>S. mansoni</i>	Yes
200-kDa tegumental protein Sm200 (worm/tegument)			Yes
Tegument antigen SmTeg (schistosomulum/tegument)	ELISA—antigen detection in serum/urine		Yes
Cathepsin B (Sm31)	ELISA—antigen detection in serum	<i>S. mansoni</i>	Yes
Secretory protein rSP13 (schistosomulum, adult worm, and egg)		<i>S. japonicum</i>	Yes
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (SjGAPDH) (adult worm)			No
Leucine amino peptidase (rSjLAP) (adult worm)			Yes
Fructose biphosphate aldolase (rSjFBPA) (adult worm)			Yes
Tadern repeat protein Sj7TR (egg/schistosomulum)			Yes
Thioredoxin peroxidase 1 (SjTPx-1) (adult worm/tegument)			Yes
Stress-induced phosphoprotein 1 (STIP1) (adult worm/tegument)			No
Cyclophilin A protein (SjCypA) (schistosomulum/subtegument)			No

(Continued)

TABLE 1 (Continued)

Antigenic target (life cycle stage)	Diagnostic approach	Parasite	Application of the test with human samples
Sj13 antigen (cercaria, adult worm, egg)	ELISA—specific antibody detection in saliva		Yes
SjP40 (cercaria, adult worm, egg)	ELISA—detection of SjP40 antigen/anti-SjP40 specific antibodies in serum		No
Hydrophilic domain of the 23-kDa membrane protein (Sj23HD) (schistosomulum/adult worm)	Detection of specific antibodies in serum by ELISA and immunoblotting		No
26-kDa glutathione S-transferase (rSj26GST)	Detection of specific antibodies in serum by MEIA		Yes
Sj14-3-3 protein (egg/adult worm)			Yes
Cercarial transformation fluid (SmCTF)	Detection of specific antibodies in serum by using a rapid diagnostic test in an ELISA format	<i>S. mansoni</i> <i>S. haematobium</i>	Yes
Recombinant calcium binding protein SjE16 (with SEA) (egg)	Detection of specific antibodies in serum by electrochemical immunosensor array (ECISA)	<i>S. japonicum</i>	Yes
Circulating cathodic antigen (adult worm)	ELISA—antigen detection in serum/urine Detection of antigen in urine by rapid lateral flow cassette assay (POC-CCA)	<i>S. mansoni</i>	Yes Yes
Circulating anodic antigen (adult worm)	ELISA—antigen detection in serum/urine Detection of antigen by UCP-LF rapid diagnostic kit, using serum	<i>S. mansoni</i> <i>S. mansoni</i>	Yes Yes
	Detection of antigen by UCP-LF rapid diagnostic kit, using urine	<i>S. japonicum</i> <i>S. japonicum</i>	Yes Yes
SjCHGC06971	Potential markers for direct antigen detection or specific antibody detection	<i>S. japonicum</i>	No
SjCHGC04754			
BUD31 homolog RNase (adult worm)			

TABLE 2 Schistosome-specific DNA and RNA targets and their application in the molecular diagnosis of human schistosomiasis

Parasite	Genetic target amplified (DNA/RNA)	Amplification technique	Type(s) of samples used for testing	
<i>S. mansoni</i>	121-bp tandem repeat sequence	Conventional PCR	Serum Feces Urine	
		Touchdown PCR	Serum	
		Real-time PCR	Serum Cerebrospinal fluid	
		PCR-ELISA	Feces	
	28S rDNA	Conventional PCR	Urine Feces	
		Cytochrome oxidase 1 (<i>cox1</i>)	Multiplex real-time PCR assay	Feces
		NADH dehydrogenase 1 (<i>nad1</i>)	Real-time PCR	Feces
		<i>nad5</i>	Multiplex PCR	Feces
		Specific regions between <i>nad6</i> and <i>cox2</i>	Multiplex PCR	Feces
		Mitochondrial minisatellite DNA sequence (620 bp)	LAMP	Feces
<i>S. haematobium</i>	DraI repeats	Conventional PCR	Urine	
		Real-time PCR	Serum/urine	
	<i>cox1</i>	Conventional PCR	Serum/urine/saliva/semen	
		Real-time PCR	Vaginal lavage fluid	
	Internal transcribed spacer rDNA (ITS) ITS 2	Multiplex real-time PCR	Feces	
	Conventional PCR	Urine		
	Real-time PCR	Urine		
<i>S. japonicum</i>	<i>SjR2</i>	Conventional PCR	Feces Serum/feces	
		Nested PCR	Serum	
		LAMP	Feces/serum	
		Nested PCR	Serum	
	<i>SjCHGCS 19</i>	Conventional PCR	Urine	
		Conventional PCR	Serum/urine/saliva	
	28S rDNA	Real-time PCR	Feces	
		Multiplex PCR	Feces	
	Specific regions between <i>nad6</i> and <i>cox2</i>	Multiplex PCR	Feces	
		Multiplex PCR	Feces	
	Specific regions between <i>nad1</i> and <i>nad2</i>	Conventional PCR	Feces	
		Real-time PCR	Feces	
	<i>nad6</i>	Real-time PCR	Feces	
		Real-time PCR	Plasma/serum	
miR-3479, miR-10, miR-3096, miR-0001, miR-277, Bantam miR223	Real-time PCR	Serum		

TABLE 3 Summary of recent studies on amplification of cell-free parasitic DNA for the diagnosis of schistosomiasis

Parasite	Gene amplified	Type(s) of samples used for testing	Subjects
<i>S. mansoni</i>	121-bp tandem repeat sequence	Serum/plasma	Animal model Humans
		Cerebrospinal fluid	Humans
	28S rDNA region	Urine	Animal model Humans
<i>S. japonicum</i>	Retrotransposon <i>SjCHGCS 19</i> gene	Serum	Animal model/humans
	Retrotransposon <i>SjR2</i> gene	Serum	Animal model Humans
	Cytochrome oxidase 1 (COX1) gene	Serum/urine/saliva	Humans
	28S rDNA region	Urine	Humans
<i>S. haematobium</i>	DraI gene	Serum/urine	Humans
	Cytochrome oxidase 1 (COX1) gene	Serum/urine/saliva/semen	Humans
	ITS rDNA region	Urine	Humans

Annexe 2 : Procédure du laboratoire de la PCR en temps réel

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 1 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

1 OBJET / PRINCIPE

Ce mode opératoire décrit la façon de procéder pour réaliser une PCR en temps réel.

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymatique). Cependant l'amplification n'est pas mesurée en fin de réaction mais tout au long de la PCR (en temps réel). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à une émission de fluorescence dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Plusieurs systèmes de détection sont utilisés pour la détection ou la quantification du signal fluorescent en temps réel : les agents intercalants et les sondes.

- **Le Sybr Green** est un agent intercalant peu fluorescent à l'état libre. Lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, il émet une fluorescence. L'augmentation de la fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (amplicons double brin). L'émission fluorescente décroît complètement lors de l'étape de dénaturation du cycle suivant.

Dans ce système, la spécificité de la réaction ne repose que sur la spécificité des amorces, sans contrôle de la taille des amplicons. Pour vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié, on réalise une courbe de fusion en fin de réaction.

- **Les sondes FRET.**

Dans ce système, on utilise 2 sondes dont l'une est porteuse en 3' d'un fluorochrome émetteur et l'autre en 5' d'un fluorochrome accepteur. Les sondes sont choisies de façon à s'hybrider à leurs séquences cibles en n'étant séparées que de 1 à 5 bases. Lorsque les deux sondes sont séparées, le fluorochrome donneur n'émet qu'un bruit de fond de fluorescence alors que lorsqu'elles sont hybridées côte à côte, la proximité des 2 fluorochromes permet le transfert de l'énergie du fluorochrome donneur vers le fluorochrome accepteur provoquant l'émission fluorescente de ce dernier (FRET : fluorescent resonance energy transfer). On mesure alors l'acquisition de la fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN spécifique synthétisée, au moment de l'hybridation.

Les sondes restant intactes (contrairement aux sondes Taqman qui sont hydrolysées), il est possible de réaliser une courbe de fusion en fin de réaction.

- **Les sondes Taqman.**

Les sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) (par exemple FAM) et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non (par exemple TAMRA) qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation.

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 2 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

2 DOMAINE D'APPLICATION

Secteur biologie moléculaire PM.

3 DOCUMENTS ASSOCIES

<http://srv-kalilab/IT-PTI-BIOM-004> - *Utilisation des LightCycler et logiciel version 4.*

<http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-023> - *Utilisation du Light Cycler 480*

<http://srv-kalilab/PG-PTI-BIOM-001> - *consigne de prévention des contaminations en biologie moléculaire*

<http://srv-kalilab/IT-BIO-MS-INFO-009> *Edition d'une liste de travail*

<http://srv-kalilab/IT-PTI-BIOM-002> *liste de travail et analyses BM parasitologie.*

4 DEFINITIONS / ABREVIATIONS

BM : biologie moléculaire.

PM : parasitologie mycologie.

5 EQUIPEMENTS / FOURNITURES

Amorces

Sondes

Coffret LightCycler Fast Start DNA Master hybridation LightCycler.

Coffret Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green.

Coffret LC 480 - PROBES MASTER

LightCycler

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 3 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

6 CONTENU

6.1 REALISATION D'UNE PCR EN TEMPS REEL.

Toutes les manipulations se feront en respectant la procédure <http://srv-kalilab/PG-PTI-BIOM-001> - *consigne de prévention des contaminations en biologie moléculaire*

6.1.1 Création de la feuille de mix

Editer la liste de travail de la PCR à réaliser à l'aide de l' <http://srv-kalilab/IT-BIO-MS-INFO-009> *Edition d'une liste de travail* et l' <http://srv-kalilab/IT-PTI-BIOM-002> *liste de travail et analyses BM parasitologie*.

Contrôler la feuille de travail avec le portoir des ADN extraits situés à +5 +/- 3 °C dans la pièce PII 332.

Déterminer le nombre de mix à faire en compilant les informations de la liste de travail éditée et de la feuille de liaison du diagnostic situé dans Sharepoint <http://srv-kalilab/DE-PTI-BIOM-002> *-fiche de liaison*.

Editer la feuille de fabrication du mix en ouvrant le fichier situé dans Sharepoint <http://srv-kalilab/DE-PTI-BIOM-001-01> *feuille de mix* et sélectionnant la feuille souhaitée.

Modifier la case nombre de mix dans le tableau de calcul en se positionnant sur la 1^{ère} case de la colonne NBR de mix.

Imprimer la feuille.

6.1.2 Etapes préalables à la fabrication du mélange réactionnel

Ces étapes se déroulent dans la pièce PII301 sous la hotte non 16S.

- **Ouverture des coffrets Taq.**

Les coffrets sont conservés à -23°C+/-5°C dans la pièce PII301.

Noter la date d'ouverture sur le coffret et le déstocker dans kalilab.

Il contient plusieurs flacons d'eau pour Light Cycler, de MgCl₂, de Fast start Enzyme et de Fast Reaction start Mix.

Avant utilisation il faut reconstituer le mix Taq de la façon suivante :

- ✓ **Coffret LightCycler Fast Start DNA Master hybridation**

Décongeler un flacon de Fast start Enzyme et de Fast start Mix.

Les centrifuger légèrement dans une centrifugeuse de paillasse.

Pipeter 60 µL de Fast Reaction start Mix dans le Fast start Enzyme.

Homogénéiser à la pipette.

Noter sur le bouchon la date de reconstitution et les initiales de l'opérateur.

Le tube sera conservé à +5+/-3°C une semaine sur le portoir « SONDE ». Il ne faut pas le recongeler.

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 4 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

✓ **Coffret Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green**

Décongeler un flacon de Fast start Enzyme et 3 flacons de Fast Reaction start Mix SYBR Green.

Les centrifuger légèrement dans une centrifugeuse de paillasse. Pipeter 10µl de Fast start Enzyme dans chacun des 3 flacons Fast Reaction start Mix SYBR Green.

Homogénéiser à la pipette.

Noter sur chaque bouchon la date de reconstitution et les initiales de l'opérateur. Un tube sera conservé à +5+/-3°C une semaine sur le portoir « SYBR » et les deux autres seront placés à -23°C+/-5°C pour une utilisation ultérieure dans le coffret en cours.

Répéter l'opération au fur et à mesure des besoins.

L'eau et le MgCl₂ sont décongelés quand nécessaire et conservés à +5+/-3°C sur le portoir « SONDE ».

✓ **Coffret Light Cycler 480 Pobes Master**

Après décongélation le flacon de mastermix peut être conservé 4 semaines à +5+/-3°C.

✓ **Kit Amplidiag stools parasite**

Le kit contient 2 tubes de master mix et 1 tube de Assay Mix1 et 2 tube Assay Mix2.

Ces réactifs sont prêts à l'emploi.

Ils se conservent 3 mois à +5+/-3°C le portoir « KIT » ou à -23°C+/-5°C jusqu'à la date de péremption.

Avant utilisation s'assurer que le kit a été calibré.

Bien vortexer chaque réactif avant utilisation.

✓ **Réalisation des Prémix Pm**

Pour certains diagnostics en technique sondes, des prémix contenant l'H₂O, le MgCl₂, les amorces et sondes sont réalisés au préalable.

Pour cela il faut éditer une feuille de prémix qui se trouve dans le fichier situé dans

Sharepoint <http://srv-kalilab/DE-PTI-BIOM-001> *feuille de prémix*

Modifier la case nombre de mix dans le tableau de calcul en se positionnant sur la 1^{ère} case de la colonne NBR de mix.

Imprimer la feuille.

Dans un microtube, pipeter les réactifs comme indiqué au niveau du tableau de calcul de la feuille de mix.

Vérifier la vacuité de l'embout à chaque pipetage.

Bien vortexer le mélange réalisé et l'aliqoter sous le volume indiqué sur la feuille de prémix.

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 5 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

Identifier les tubes avec Pm-diagnostic +date et opérateur et les conserver dans la boîte diagnostic. Renseigner sur une étiquette le nom du Prémix, la date de fabrication, l'opérateur et la péremption.

Ranger la feuille de suivi de lots dans le classeur « suivi de lots MIX » et la traçabilité sera assurée sur ce support.

✓ **Realisation des mix conservés en capillaires**

Pour cela il faut éditer une feuille de prémix qui se trouve dans le fichier situé dans Sharepoint

<http://srv-kalilab/DE-PTI-BIOM-001-01> **feuille de prémix**

Modifier la case nombre de mix dans le tableau de calcul en se positionnant sur la 1^{ère} case de la colonne NBR de mix.

Imprimer la feuille.

Dans un microtube, pipeter les réactifs comme indiqué au niveau du tableau de calcul de la feuille de mix.

Vérifier la vacuité de l'embout à chaque pipetage.

Bien vortexer le mélange réalisé

Prendre une boîte stérile (à capillaires sans bouchon) qui se trouve dans le placard de la pièce y placer le nombre de capillaires nécessaires.

Répartir le mix en procédant de la même façon que pour un mix extemporané.

Une fois le mix déposé il faudra noter sur la boîte le numéro du lot, la nature du mix, la quantité de mix par capillaire, l'opérateur, la date de fabrication et la date de péremption et déposer la boîte à -23+/-5 °C dans la pièce PII301.

Lors de l'utilisation de ce lot, une feuille de test sera éditée et rangée dans le classeur lot de mix et la traçabilité sera faite sur cette feuille.

6.1.3 Fabrication du mélange réactionnel.

Cette étape se déroule dans la pièce PII301 sous la hotte non 16S.

- **Réalisation du mix réactionnel**

Sortir le bloc réfrigéré et le portoir SONDE, SYBR ou KIT situé à +5+/-3°C.

Décongeler les amorces, prémix, ou réactifs commerciaux nécessaires au diagnostic situées dans les boîtes spécifiques à -23°C+/-5°C.

Les sondes peuvent rester 10 jours au réfrigérateur après décongélation.

Réaliser les dilutions d'emploi des amorces comme indiquées sur les feuilles de mix. Les dilutions pourront être congelées pour une utilisation ultérieure une seule fois. Noter la date de dilution et l'opérateur sur la tranche et noter également sur le tube des sondes la date de décongélation.

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 6 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

Bien vortexer le MgCl₂.

Dans un microtube, pipeter les réactifs comme indiqué au niveau du tableau de calcul de la feuille de mix.

Vérifier la vacuité de l'embout à chaque pipetage.

Remettre le portoir et le bloc réfrigéré à +5 +/-3°C et éventuellement recongeler les dilutions d'amorces.

6.1.4 Répartition du mix réactionnel.

- **Mix extemporané LC capillaire**

La répartition du Mix se déroulera dans la pièce PII332.

Sortir un support à capillaire situé à +5 +/-3°C.

Placer sur ce support le nombre de capillaires nécessaires.

Homogénéiser le mix réactionnel.

Répartir la quantité de mix indiquée sur la feuille de mix dans les capillaires en prenant soin de coller au bord du capillaire l'embout de pipette et de ne pas aller au 2eme cran du poussoir de la pipette. On peut garder le même embout pour tous les capillaires.

A la fin il ne doit rien rester dans le tube. En cas de manque ou d'excès significatif de mix, il faut le jeter et recommencer un nouveau mix.

- **Mix kit Amplidiag stools parasite**

La répartition du Mix se déroulera dans la pièce PII332.

Sortir une plaque blanche CFX.

Homogénéiser le mix réactionnel.

Répartir la quantité de mix indiquée sur la feuille de mix dans la plaque selon le schéma défini dans la au <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-168> **Détection multiplex dans les selles par Amplidiag Stool Parasite** en prenant soin de coller au bord du puits l'embout de pipette et de ne pas aller au 2ème cran du poussoir de la pipette. On peut garder le même embout pour tous les puits.

En cas de manque ou d'excès significatif de mix, il faut le jeter et recommencer un nouveau mix.

- **Mix capillaires congelés.**

Pour réaliser une PCR avec des capillaires congelés, prendre le nombre de capillaires nécessaires et les transporter vers la pièce PII 332 dans une boîte fermée (préalablement stérilisée et qui se trouve dans le placard de la pièce PII 301).

Dans la pièce PII 332, sortir un support à capillaire situé à +5°C +/-3°C et y placer les capillaires décongelés.

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 7 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

- **Mix extemporané LC 480.**

La répartition du Mix se déroulera dans la pièce PII332.

Sortir une plaque blanche 480.

Homogénéiser le mix réactionnel.

Répartir la quantité de mix indiquée sur la feuille de mix dans la plaque selon le schéma défini.

On peut garder le même embout pour tous les puits d'un même mix.

En cas de manque ou d'excès significatif de mix, il faut le jeter et recommencer un nouveau mix.

6.1.5 Dépôt des ADN.

Le dépôt d'ADN s'effectue dans la pièce PII332.

Sortir les ADN à amplifier qui sont conservés à +5 °C+/-3°C dans la pièce PII332.

Décongeler les témoins nécessaires qui se trouvent à -23+/-5 °C dans la pièce PII332 dans des boîtes spécifiques à chaque diagnostic.

Vortexer les échantillons et les témoins puis les centrifuger brièvement avec une centrifugeuse de paillasse.

Déposer la quantité d'ADN indiqué sur la feuille de mix ou sur la liste de travail dans les capillaires ou la plaque en suivant la liste de travail.

Boucher les capillaires ou les barrettes au fur et à mesure des dépôts pour le cfx et les plaques de 480 seront scellées avec un film plastique en fin de dépôt à l'aide de la raclette en prenant bien soin de ne pas faire de bulles qui gênerait la lecture.

6.1.6 Mise en route de la PCR.

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 8 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

Les thermocyclers Lightcyler capillaires, LC 480 et le cfx se trouvent dans la pièce PII332.

Pour lancer une PCR temps réel sur :

- **LightCycler capillaires:**

Placer les capillaires dans l'ordre de la liste de travail sur le carrousel associé au Light Cyler utilisé (comme indiqué sur la feuille de mix ou de paillasse).

Centrifuger le carrousel dans la centrifugeuse associée au Light Cyler utilisé.

Vérifier que le niveau de remplissage des capillaires soit parfaitement homogène.

Placer le carrousel dans le Light Cyler à utiliser.

Sélectionner le programme indiqué sur la liste de travail ou la feuille de mix.

Mettre en route l'appareil suivant le mode opératoire <http://srv-kalilab/IT-PTI-BIOM-004> - **Utilisation des LightCycler et logiciel version 4.**

- **PCR Amplidiag stools parasite sur CFX :**

Centrifuger la plaque dans la centrifugeuse dédiée en PII332, 2mn à 3300 tr/mn.

Placer la plaque dans le CFX.

Mettre en route l'appareil suivant le mode opératoire <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-168>

Détection multiplex dans les selles par Amplidiag Stool Parasite pour lancer

- **PCR sur LC480 :**

Centrifuger la plaque dans la centrifugeuse dédiée en PII332, 2mn à 3300 tr/mn.

Placer la plaque dans le LC 480.

Mettre en route l'appareil suivant le mode opératoire <http://srv-kalilab/MT-PTI-BIOM-023> -

Utilisation du Light Cyler 480

Mode opératoire Technique MT	PCR en temps réel	Page : 9 / 9
------------------------------------	-------------------	--------------

6.2 COLLECTE ET ANALYSE DES RESULTATS.

A la fin du RUN, imprimer les résultats et les exporter sur le système de sauvegarde externe puis ramener les documents dans la pièce PII336 pour analyse et saisie.

Valider la manipulation selon les critères définis dans les modes opératoires.

Saisir les valeurs des contrôles internes dans le module **contrôle qualité** de Molis selon l'<http://srv-kalilab/IT-BIO-MS-INFO-011>. *Utilisation du module QC* et à l'aide de l' <http://srv-kalilab/IT-PTI-BIOM-003> *Code de saisie et gestion CQI BM parasito.*

Rentrer les résultats dans Molis dans le module **Saisie des résultats de microbiologie** à l'aide du code liste de travail spécifique référencé dans <http://srv-kalilab/IT-PTI-BIOM-002> *liste de travail et analyses BM parasitologie.*

Puis valider les résultats dans **Validation des Résultats**, dans l'onglet Option, mettre dans **Actions de validation** « FVALT_BPE » BM Para Extraction Exécuter, là s'affiche les différents dossiers de patients, les **Valider** et faire **Suivant** pour les prochains.

Pour la validation, on peut travailler sur tous les diagnostics, ou alors juste en rentrant les **numéros** de feuilles de travail pour chaque diagnostic.

Enfin, mettre les résultats forme papier dans la bannette pour validation biologique.

Congeler les ADN dans les boîtes spécifiques conservées à -23°C+/-5°C dans la pièce PII332. Lorsque les boîtes sont pleines elles sont stockées à -80°C+/-5°C dans la pièce PII 327.

Une fois la validation biologique terminée, archiver les résultats dans les boîtes spécifiques à chaque diagnostic en pièce PII336.

7 CONDUITE A TENIR EN CAS D'ANOMALIE

Avertir le biologiste qui définira la conduite à tenir.

Fin de document

Annexe 3 : Composition du mix PCR matrice séquençage IT2

DE-PTI-BIOM-001			
MIX SchPanITS2 sq			
date :			
opérateur:			
Péremption			
mis en service le			
terminé le			
N° lot			
conditions de PCR:			
technique		classique	
concentration finale amorce SchPanITS2-FW		0,5 µM	
concentration finale amorce SchPanITS2-RV		0,5 µM	
concentration finale Mgcl2		3 mM	
quantité de mix		45 µL	
conditions de mix			
Réactifs	volume pour 1 mix	nbre de mix	volume à pipeter
Thermostart hot start taq	0,25	50	12,5
SchPanITS2-FW (100µM)	0,25	50	12,5
SchPanITS2-RV (100µM)	0,25	50	12,5
Tampon 5X	10	50	500
H2O	34,25	50	1713
	45		2250
à aliquoter sous 45 µL en microtube de 0,2			

Bibliographie

1. Organisation Mondiale de la Santé. Schistosomiase (bilharziose) [Internet]. 2020. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
2. ANOFEL, Sandrine Houzé, Françoise Botterel-Chartier. Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et des pratiques diagnostiques - Elsevier Masson. 2018.
3. Kincaid-Smith J, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. *Trends Parasitol.* août 2017;33(8):600-9.
4. Société Française de Microbiologie. Référentiel en microbiologie Médicale. 2018.
5. Guegan H, Fillaux J, Charpentier E, Robert-Gangneux F, Chauvin P, Guemas E, et al. Real-time PCR for diagnosis of imported schistosomiasis. Doenhoff MJ, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis.* 11 sept 2019;13(9):e0007711.
6. Coon DR. Schistosomiasis: Overview of the history, biology, clinicopathology, and laboratory diagnosis. *Clin Microbiol Newsl.* nov 2005;27(21):163-8.
7. Di Bella S, Riccardi N, Giacobbe DR, Luzzati R. History of schistosomiasis (bilharziasis) in humans: from Egyptian medical papyri to molecular biology on mummies. *Pathog Glob Health.* 4 juill 2018;112(5):268-73.
8. Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D. Genomes and geography: genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasit Vectors.* déc 2011;4(1):131.
9. Lewis FA, Tucker MS. Schistosomiasis. In: Toledo R, Fried B, éditeurs. *Digenetic Trematodes.* New York, NY: Springer New York; 2014. p. 47-75. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 766).
10. Ross AGP, Chau TN, Inobaya MT, Olveda RM, Li Y, Harn DA. A new global strategy for the elimination of schistosomiasis. *Int J Infect Dis.* janv 2017;54:130-7.
11. Lingscheid T, Kurth F, Clerinx J, Marocco S, Trevino B, Schunk M, et al. Schistosomiasis in European Travelers and Migrants: Analysis of 14 Years TropNet Surveillance Data. *Am J Trop Med Hyg.* 2 août 2017;97(2):567-74.
12. van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CWN, Nagelkerke NJD, Habbema JDF, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.* mai 2003;86(2-3):125-39.
13. Haute Autorité de Santé. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la schistosomose (bilharziose). 2017;53.
14. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne J-F, Huyse T, Mas-Coma S, et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(8):971-9.

15. Kjetland EF, Hegertun IE, Baay MF, Onsrud M, Ndhlovu PD, Taylor M. Genital schistosomiasis and its unacknowledged role on HIV transmission in the STD intervention studies. *Int J STD AIDS*. sept 2014;25(10):705-15.
16. Brodish PH, Singh K. Association Between *Schistosoma haematobium* Exposure and Human Immunodeficiency Virus Infection Among Females in Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*. 4 mai 2016;94(5):1040-4.
17. Weerakoon KGAD, Gobert GN, Cai P, McManus DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*. oct 2015;28(4):939-67.
18. Steiner F, Ignatius R, Friedrich-Jaenicke B, Dieckmann S, Harms G, Poppert S, et al. Acute Schistosomiasis in European Students Returning From Fieldwork at Lake Tanganyika, Tanzania: Table 1. *J Travel Med*. 1 nov 2013;20(6):380-3.
19. Agbessi C-A, Bourvis N, Fromentin M, Jaspard M, Teboul F, Bougnoux M-E, et al. La bilharziose d'importation chez les voyageurs : enquête en France métropolitaine. *Rev Médecine Interne*. 1 août 2006;27(8):595-9.
20. Meltzer E, Artom G, Marva E, Assous MV, Rahav G, Schwartz E. Schistosomiasis among Travelers: New Aspects of an Old Disease. *Emerg Infect Dis*. nov 2006;12(11):1696-700.
21. Noël H, Ruello M, Maccary A, Pelat C, Sommen C, Boissier J, et al. Large outbreak of urogenital schistosomiasis acquired in Southern Corsica, France: monitoring early signs of endemicization? *Clin Microbiol Infect*. mars 2018;24(3):295-300.
22. Gautret P, Mockenhaupt FP, von Sonnenburg F, Rothe C, Libman M, Van De Winkel K, et al. Local and International Implications of Schistosomiasis Acquired in Corsica, France. *Emerg Infect Dis*. oct 2015;21(10):1865-8.
23. Boissier J, Kincaid-Smith J, Berry A, Allienne J-F, Fillaux J, Toulza È. Changements globaux et infections parasitaires à mollusques vecteurs: Un schistosome hybride atteint l'Europe. *médecine/sciences*. nov 2015;31(11):962-4.
24. Berry A, Fillaux J, Martin-Blondel G, Boissier J, Iriart X, Marchou B, et al. Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Eurosurveillance*. 7 janv 2016;21(1):30100.
25. Ramalli L, Mulero S, Noël H, Chiappini J-D, Vincent J, Barré-Cardi H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013. *Eurosurveillance*. 25 janv 2018;23(4).
26. Oleaga A, Rey O, Polack B, Grech-Angelini S, Quilichini Y, Pérez-Sánchez R, et al. Epidemiological surveillance of schistosomiasis outbreak in Corsica (France): Are animal reservoir hosts implicated in local transmission? *PLoS Negl Trop Dis*. 24 juin 2019;13(6).
27. Anses. Avis relatif à la surveillance nationale des cas autochtones de bilharziose urogénitale. 2015;7.
28. Webster BL, Southgate VR. Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*. *Parasitology*. sept 2003;127(3):231-42.

29. Berry A, Moné H, Iriart X, Mouahid G, Aboo O, Boissier J, et al. *Schistosomiasis haematobium*, Corsica, France. *Emerg Infect Dis.* sept 2014;20(9):1595-7.
30. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Schistosomiasis. 2020.
31. Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am.* juin 2012;26(2):383-97.
32. Collège des Universités des Maladies infectieuses et Tropicales. *E. Pilly Maladies infectieuses et tropicales 2020, 27e édition.*
33. Agbessi C-A, Bourvis N, Fromentin M, Jaspard M, Teboul F, Bougnoux M-E, et al. La bilharziose d'importation chez les voyageurs : enquête en France métropolitaine. *Rev Médecine Interne.* août 2006;27(8):595-9.
34. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *The Lancet.* juin 2014;383(9936):2253-64.
35. Berry A, Iriart X, Fillaux J, Magnaval J-F. Schistosomose urogénitale et cancer. *Bull Société Pathol Exot.* févr 2017;110(1):68-75.
36. Mbabazi PS, Andan O, Fitzgerald DW, Chitsulo L, Engels D, Downs JA. Examining the Relationship between Urogenital Schistosomiasis and HIV Infection. *Carvalho EM, éditeur. PLoS Negl Trop Dis.* 6 déc 2011;5(12):e1396.
37. Wall KM, Kilembe W, Vwalika B, Dinh C, Livingston P, Lee Y-M, et al. Schistosomiasis is associated with incident HIV transmission and death in Zambia. *Bustinduy AL, éditeur. PLoS Negl Trop Dis.* 13 déc 2018;12(12):e0006902.
38. Hannah J Russell, James M StJ Penney, Cortland Linder,, Stephen A Spencer. A cross-sectional study of periportal fibrosis and *Schistosoma mansoni* infection among school-aged children in a hard-to-reach area of Madagascar. mars 2020;
39. Ross AG, McManus DP, Farrar J, Hunstman RJ, Gray DJ, Li Y-S. Neuroschistosomiasis. *J Neurol.* janv 2012;259(1):22-32.
40. Ferrari TCA, Moreira PRR. Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. *Lancet Neurol.* sept 2011;10(9):853-64.
41. King CH, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn.* mars 2008;4(1):65-79.
42. Cioli D, Pica-Mattoccia L, Basso A, Guidi A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Mol Biochem Parasitol.* juin 2014;195(1):23-9.
43. Commission de la transparence : praziquantel (HAS) 2016
44. Dömling A, Khoury K. Praziquantel and Schistosomiasis. *ChemMedChem.* 3 sept 2010;5(9):1420-34.
45. Rochat L, Bizzini A. Enseignements tirés d'une cohorte de 42 voyageurs exposés. 2015;6.

46. Vale N, Gouveia MJ, Rinaldi G, Brindley PJ, Gärtner F, Correia da Costa JM. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2017;61(5):e02582-16, e02582-16.
47. Guiguen C, Belaz S, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P. Les bilharzioses : aspects épidémiologiques et diagnostiques. *Rev Francoph Lab.* déc 2013;2013(457):75-85.
48. Gryseels B, Mbaye A, De Vlas SJ, Stelma FF, Guisse F, Van Lieshout L, et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Int Health.* nov 2001;6(11):864-73.
49. Siqueira L da P, Fontes DAF, Aguilera CSB, Timóteo TRR, Ângelos MA, Silva LCPBB, et al. Schistosomiasis: Drugs used and treatment strategies. *Acta Trop.* déc 2017;176:179-87.
50. Pérez del Villar L, Burguillo FJ, López-Abán J, Muro A. Systematic Review and Meta-Analysis of Artemisinin Based Therapies for the Treatment and Prevention of Schistosomiasis. Keiser J, éditeur. *PLoS ONE.* 21 sept 2012;7(9):e45867.
51. OMS. Schistosomiase : rapport de situation 2001-2012 : plan stratégique 2012-2020. :80.
52. Tanaka H, Tsuji M. From discovery to eradication of schistosomiasis in Japan: 1847–1996. *Int J Parasitol.* déc 1997;27(12):1465-80.
53. French MD, Churcher TS, Gambhir M, Fenwick A, Webster JP, Kabatereine NB, et al. Observed Reductions in *Schistosoma mansoni* Transmission from Large-Scale Administration of Praziquantel in Uganda: A Mathematical Modelling Study. Galvani AP, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis.* 23 nov 2010;4(11):e897.
54. Koukounari A, Gabrielli AF, Touré S, Bosqué-Oliva E, Zhang Y, Sellin B, et al. *Schistosoma haematobium* Infection and Morbidity Before and After Large-Scale Administration of Praziquantel in Burkina Faso. *J Infect Dis.* sept 2007;196(5):659-69.
55. Fenwick A. Egypt's schistosomiasis control programme in the 1980s prepared the ground for the global elimination of schistosomiasis by 2030. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 janv 2019;113(1):1-3.
56. Bockarie MJ, Kelly-Hope LA, Rebollo M, Molyneux DH. Preventive chemotherapy as a strategy for elimination of neglected tropical parasitic diseases: endgame challenges. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 5 août 2013;368(1623):20120144.
57. Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* oct 2000;77(1):41-51.
58. Olveda DU, McManus DP, Ross AGP. Mass drug administration and the global control of schistosomiasis: successes, limitations and clinical outcomes. *Curr Opin Infect Dis.* déc 2016;29(6):595-608.
59. Bangert M, Bancalari P, Mupfasoni D, Mikhailov A, Gabrielli AF, Montresor A. Provision of deworming intervention to pregnant women by antenatal services in countries endemic for soil-transmitted helminthiasis. Siles-Lucas M, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis.* 13 mai 2019;13(5):e0007406.

60. Merrifield M, Hotez PJ, Beaumier CM, Gillespie P, Strych U, Hayward T, et al. Advancing a vaccine to prevent human schistosomiasis. *Vaccine*. juin 2016;34(26):2988-91.
61. Recommendations for comprehensive post-arrival health assessment for people from refugee-like backgrounds, RheaNA, 2016
62. Gray DJ, Ross AG, Li Y-S, McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ*. 17 mai 2011;342(may17 1):d2651-d2651.
63. Beltrame A, Guerriero M, Angheben A, Gobbi F, Requena-Mendez A, Zammarchi L, et al. Accuracy of parasitological and immunological tests for the screening of human schistosomiasis in immigrants and refugees from African countries: An approach with Latent Class Analysis. Keiser J, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 5 juin 2017;11(6):e0005593.
64. Kinkel H-F, Dittrich S, Bäumer B, Weitzel T. Evaluation of Eight Serological Tests for Diagnosis of Imported Schistosomiasis. *Clin Vaccine Immunol*. juin 2012;19(6):948-53.
65. He P, Song L, Xie H, Liang J, Yuan D, Wu Z, et al. Nucleic acid detection in the diagnosis and prevention of schistosomiasis. *Infect Dis Poverty*. déc 2016;5(1):25.
66. van Gool T, Vetter H, Vervoort T, Doenhoff MJ, Wetsteyn J, Overbosch D. Serodiagnosis of Imported Schistosomiasis by a Combination of a Commercial Indirect Hemagglutination Test with *Schistosoma mansoni* Adult Worm Antigens and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with *S. mansoni* Egg Antigens. *J Clin Microbiol*. 1 sept 2002;40(9):3432-7.
67. Smith H, Doenhoff M, Aitken C, Bailey W, Ji M, Dawson E, et al. Comparison of *Schistosoma mansoni* Soluble Cercarial Antigens and Soluble Egg Antigens for Serodiagnosing Schistosome Infections. Jones MK, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 13 sept 2012;6(9):e1815.
68. Doenhoff MJ, Chiodini PL, Hamilton JV. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? *Trends Parasitol*. janv 2004;20(1):35-9.
69. van Lieshout L, Polderman AM, Deelder AM. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop*. oct 2000;77(1):69-80.
70. Cavalcanti MG, Cunha AFA, Peralta JM. The Advances in Molecular and New Point-of-Care (POC) Diagnosis of Schistosomiasis Pre- and Post-praziquantel Use: In the Pursuit of More Reliable Approaches for Low Endemic and Non-endemic Areas. *Front Immunol*. 28 mai 2019;10:858.
71. Fillié YE, Van Lieshout L, Kornelis D, Deelder AM. Evaluation of an ELISA for combined measurement of CAA and CCA in *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*. sept 1994;57(4):279-87.
72. Obeng BB, Aryeetey YA, de Dood CJ, Amoah AS, Larbi IA, Deelder AM, et al. Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of *Schistosoma haematobium* in urine samples from Ghana. *Ann Trop Med Parasitol*. oct 2008;102(7):625-33.
73. De Sousa SRM, Dias IHL, Fonseca ALS, Contente BR, Nogueira JFC, da Costa Oliveira TN, et al. Concordance of the point-of-care circulating cathodic antigen test for the diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low endemicity area. *Infect Dis Poverty*. déc 2019;8(1):37.

74. Wang C, Chen L, Yin X, Hua W, Hou M, Ji M, et al. Application of DNA-based diagnostics in detection of schistosomal DNA in early infection and after drug treatment. *Parasit Vectors*. 2011;4(1):164.
75. Fernández-Soto P, Gandasegui Arahuetes J, Sánchez Hernández A, López Abán J, Vicente Santiago B, Muro A. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of *Schistosoma mansoni* in Stool Samples: A Diagnostic Approach in a Murine Model. *Jex AR, éditeur. PLoS Negl Trop Dis*. 4 sept 2014;8(9):e3126.
76. Elyse Poitras, Alain Houde. La PCR en temps réel: principes et applications. déc 2002;11.
77. Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. juill 2009;460(7253):352-8.
78. Pierce RJ, Mitta G, Roger E. Les génomes des schistosomes : une étape clé dans la lutte contre la bilharziose. *médecine/sciences*. août 2009;25(8-9):761-2.
79. Dias-Neto E, Katz N, Rabello A, Pontes LA, Oliveira MC. Comparison of a Polymerase Chain Reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 1 juin 2003;68(6):652-6.
80. Hamburger J, Turetski T, Kapeller I, Deresiewicz R. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol Biochem Parasitol*. janv 1991;44(1):73-80.
81. Wichmann D, Poppert S, Von Thien H, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, et al. Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect Dis*. déc 2013;13(1):55.
82. Espírito-Santo MCC, Alvarado-Mora MV, Pinto PLS, de Brito T, Botelho-Lima L, Heath AR, et al. Detection of *Schistosoma mansoni* infection by TaqMan® Real-Time PCR in a hamster model. *Exp Parasitol*. août 2014;143:83-9.
83. Dias-Neto E, Pontes LA, Rabello A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg*. 1 févr 2002;66(2):157-62.
84. Oliveira LMA, Santos HLC, Gonçalves MML, Barreto MGM, Peralta JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. déc 2010;68(4):416-21.
85. Attwood SW, Upatham ES, Meng XH, Qiu D-C, Southgate VR. The phylogeography of Asian *Schistosoma* (Trematoda: Schistosomatidae). *Parasitology*. août 2002;125(2):99-112.
86. Zhou L, Tang J, Zhao Y, Gong R, Lu X, Gong L, et al. A highly sensitive TaqMan real-time PCR assay for early detection of *Schistosoma* species. *Acta Trop*. oct 2011;120(1-2):88-94.
87. Cnops L, Tannich E, Polman K, Clerinx J, Van Esbroeck M. *Schistosoma* real-time PCR as diagnostic tool for international travellers and migrants: *Schistosoma* real-time PCR as diagnostic tool. *Trop Med Int Health*. oct 2012;17(10):1208-16.

88. Sandoval N, Siles-Lucas M, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Puente S, López-Abán J, et al. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. *Parasitology*. nov 2006;133(05):581.
89. Cnops L, Soentjens P, Clerinx J, Van Esbroeck M. A *Schistosoma haematobium*-Specific Real-Time PCR for Diagnosis of Urogenital Schistosomiasis in Serum Samples of International Travelers and Migrants. Lammie PJ, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 29 août 2013;7(8):e2413.
90. Ruppel A, Ramzy RM, He-Na, Jourdane J, Abbasi I, Hamburger J. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. *Am J Trop Med Hyg*. 1 déc 2001;65(6):907-11.
91. Guo J-J, Zheng H-J, Xu J, Zhu X-Q, Wang S-Y, Xia C-M. Sensitive and Specific Target Sequences Selected from Retrotransposons of *Schistosoma japonicum* for the Diagnosis of Schistosomiasis. Zhou X-N, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis*. 27 mars 2012;6(3):e1579.
92. Xia C-M, Rong R, Lu Z-X, Shi C-J, Xu J, Zhang H-Q, et al. *Schistosoma japonicum* : A PCR assay for the early detection and evaluation of treatment in a rabbit model. *Exp Parasitol*. févr 2009;121(2):175-9.
93. Kato-Hayashi N, Leonardo LR, Arevalo NL, Tagum MaNB, Apin J, Agsolid LM, et al. Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines. *Acta Trop*. janv 2015;141:178-83.
94. Lier T, Johansen MV, Hjelmevoll SO, Vennervald BJ, Simonsen GS. Real-time PCR for detection of low intensity *Schistosoma japonicum* infections in a pig model. *Acta Trop*. janv 2008;105(1):74-80.
95. Gobert GN, Chai M, Duke M, McManus DP. Copro-PCR based detection of *Schistosoma* eggs using mitochondrial DNA markers. *Mol Cell Probes*. août 2005;19(4):250-4.
96. Ten Hove RJ, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. févr 2008;102(2):179-85.
97. Kato-Hayashi N, Kirinoki M, Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V, Matsuda H, et al. Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain reaction. *Exp Parasitol*. mars 2010;124(3):325-9.
98. Littlewood DTJ, Lockyer AE, Webster BL, Johnston DA, Le TH. The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Mol Phylogenet Evol*. mai 2006;39(2):452-67.
99. Cirad - La recherche agronomique pour le développement [Internet]. Disponible sur: <https://www.cirad.fr/>
100. Cheng G, Luo R, Hu C, Cao J, Jin Y. Deep sequencing-based identification of pathogen-specific microRNAs in the plasma of rabbits infected with *Schistosoma japonicum*. *Parasitology*. déc 2013;140(14):1751-61.

101. Carvalho GC de, Marques LH dos S, Gomes LI, Rabello A, Ribeiro LC, Scopel KKG, et al. Polymerase chain reaction for the evaluation of *Schistosoma mansoni* infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. nov 2012;107(7):899-902.
102. Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Kanazawa T. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. Parasitol Int. sept 2006;55(3):213-8.
103. Clerinx J, Bottieau E, Wichmann D, Tannich E, Van Esbroeck M. Acute Schistosomiasis in a Cluster of Travelers From Rwanda: Diagnostic Contribution of Schistosome DNA Detection in Serum Compared to Parasitology and Serology. J Travel Med. 1 nov 2011;18(6):367-72.

DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE PAN-SCHISTOSOMA

Présentée et soutenue publiquement par : BENDJELLOUL Imane

Directeur de thèse : BERRY Antoine, PU-PH, Parasitologie-mycologie

RESUME

Face à l'abandon inéluctable de la microscopie pour la plupart des diagnostics microbiologiques, les outils de biologie moléculaire, connus pour leur très bonne spécificité et sensibilité, occuperont alors une grande place. Le diagnostic de la schistosomose fera partie de cette révolution. Cette étude avait pour objectif de développer un outil de diagnostic moléculaire pan-*Schistosoma*, en complément des PCR de routine, spécifiques de *S. mansoni* et de *S. haematobium* utilisées dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse. La PCR pan-*Schistosoma* en temps réel ciblant ITS2 mises au point a permis la détection de toutes les espèces avec une même sensibilité. Le séquençage a permis de différencier les espèces asiatiques des espèces africaines, ainsi que certains hybrides.

DEVELOPMENT OF A PAN-SCHISTOSOMA MOLECULAR DIAGNOSTIC TOOL

Because of the inevitable discontinuation of microscopy for microbiological diagnostics, molecular biology tools, known for their good specificity and sensitivity, will then play an important role. The diagnosis of schistosomiasis will be part of this revolution. The objective of this study was to develop a pan-*Schistosoma* molecular diagnostic tool, in addition to the PCR specific to *S. mansoni* and *S. haematobium* routinely used in the Parasitology-Mycology Department of the Toulouse University Hospital Center. The real-time pan-*Schistosoma* PCR targeting ITS2 allowed the detection of all species with the same sensitivity. Sequencing allowed to differentiate Asian species from African species, as well as some hybrids.

Mots clés : pan-*Schistosoma*, schistosomose, PCR en temps réel, séquençage, ITS2

DISCIPLINE administrative : Diplôme d'études spécialisées de Biologie médicale

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE : Parasitologie – Mycologie CHU de Toulouse Purpan
Institut Fédératif de Biologie (IFB), 330 Avenue de Grande Bretagne 31059 Toulouse