

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

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

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

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

I.1. Objectif de l'étude HELMINFAG

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

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

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

I.2. Matériel et méthodes

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

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

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

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

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

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

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

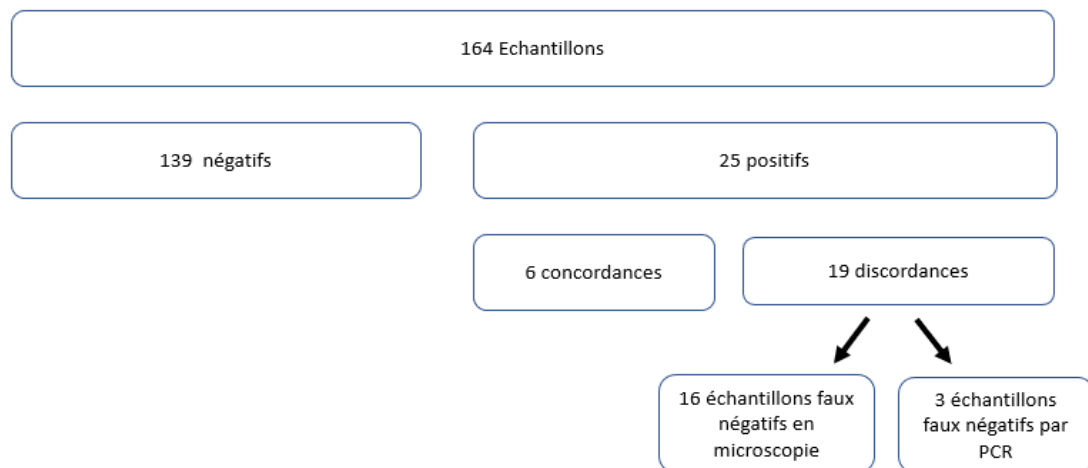


Figure 21 : Description de la corrélation de méthode sur les échantillons de l'étude HELMINFAG (n=164).

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

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

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

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

II.1. Contexte de l'étude PALUSTOP

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

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

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



Figure 22 : Localisation du village de Trois-Palétuviers.

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

II.2. Matériel et méthodes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II.3. Résultats

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

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

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

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

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

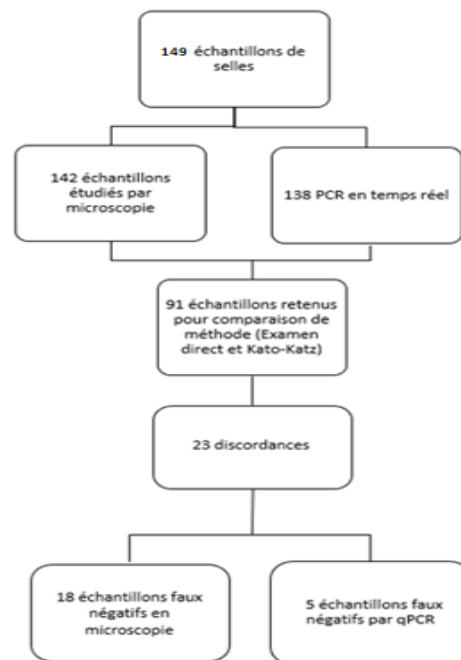


Figure 23 : Echantillons retenus pour la corrélation de méthodes chez les échantillons de Trois palétuviers.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

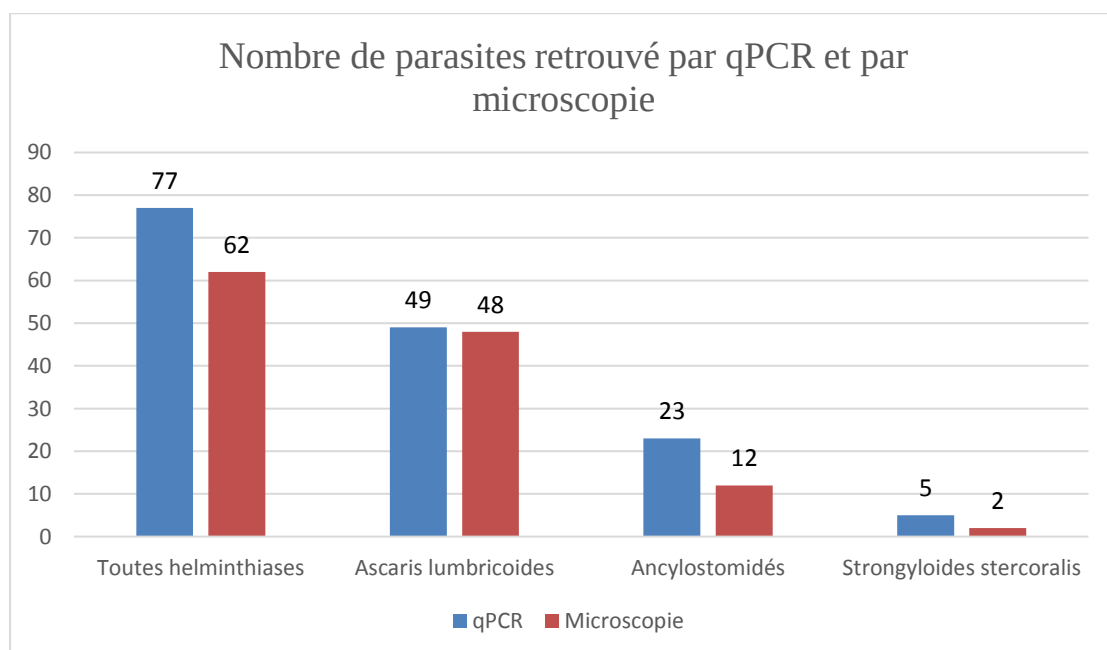


Figure 24 : Représentation graphique du nombre d'échantillons retrouvés positifs par les deux techniques par parasite.

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

Polyparasitisme

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

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

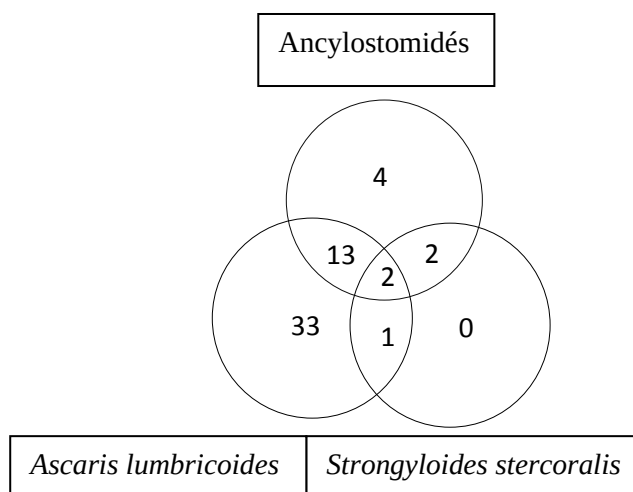
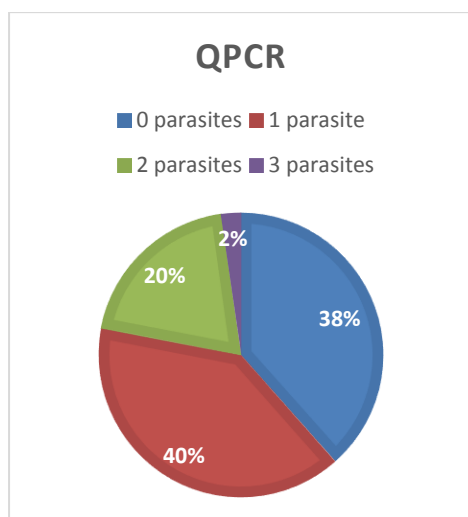
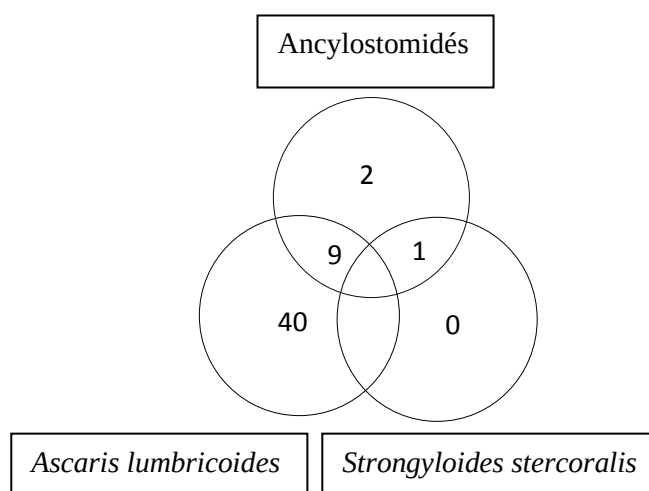
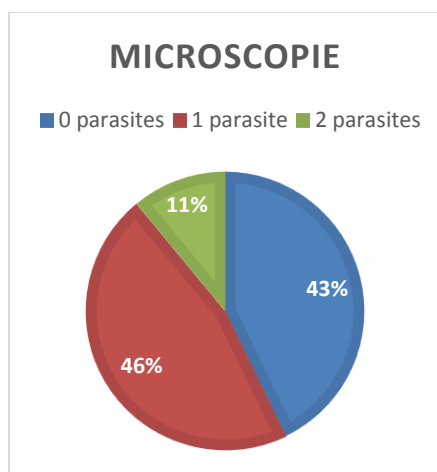


Figure 25 : Représentation graphique des résultats obtenus par microscopie et qPCR sur les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).

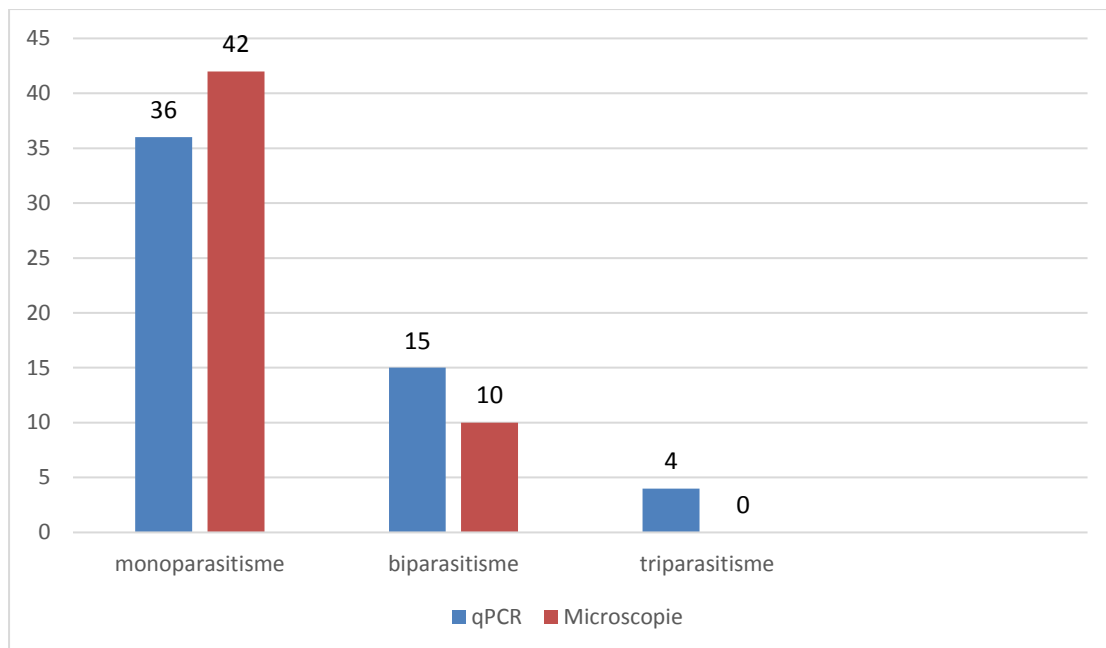


Figure 26 : Représentation graphique du nombre de mono/bi/tri/parasitisme retrouvés par microscopie et qPCR dans les échantillons de Trois-Palétuviers (n=91).

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

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

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

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

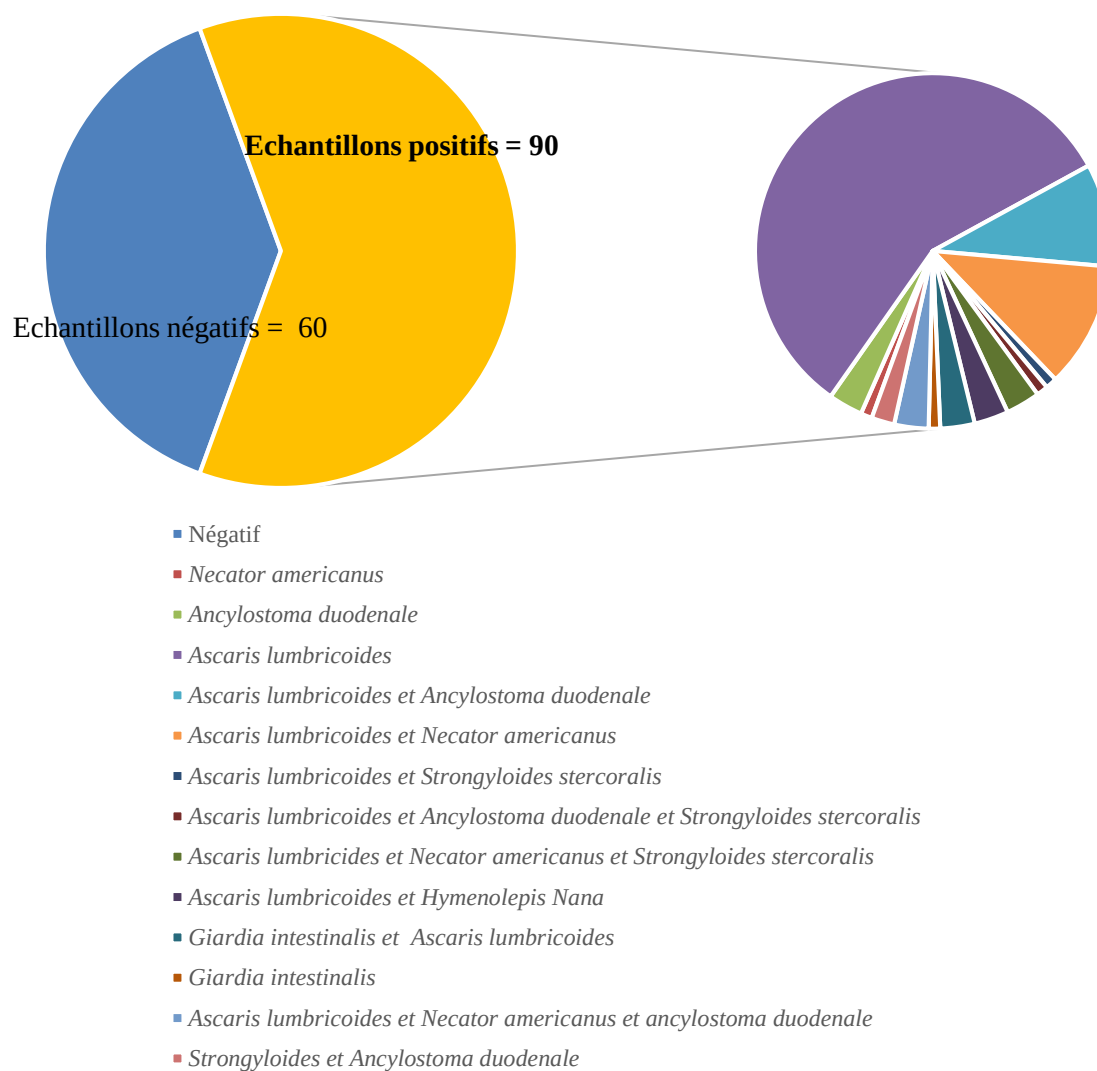


Figure 27 : Répartition des cas de parasitoses intestinales dans le village de Trois-Palétuviers.

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

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

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

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

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

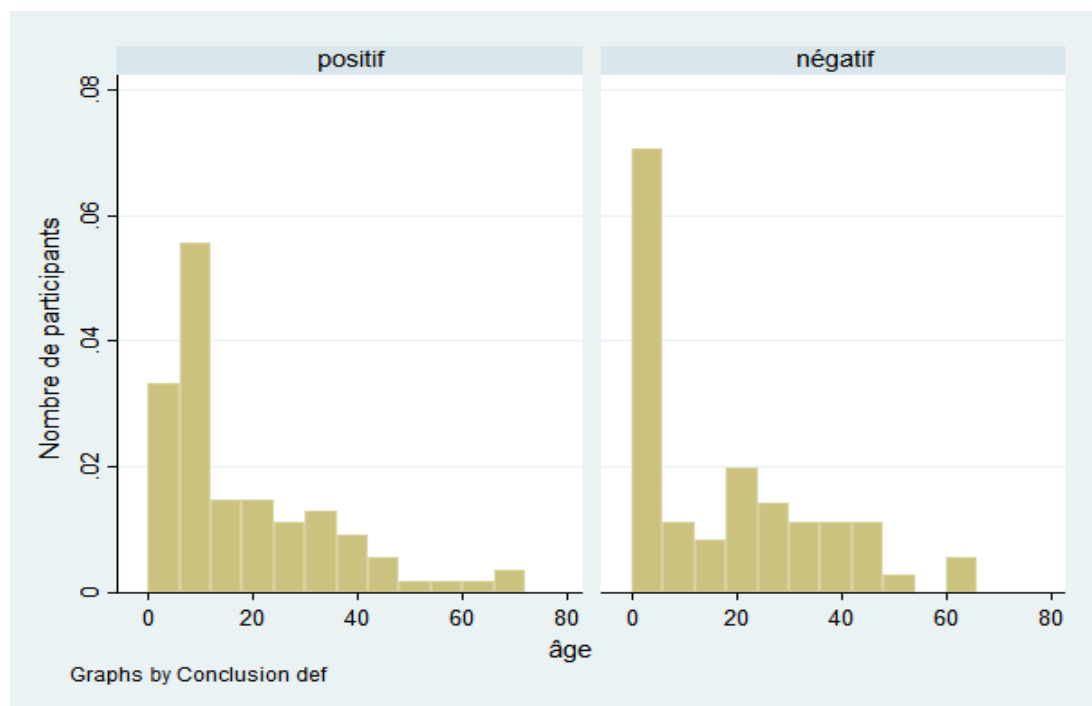


Figure 28 : Répartition des cas de parasitoses intestinales en fonction de l'âge dans la population de Trois-Palétuviers.

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

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

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

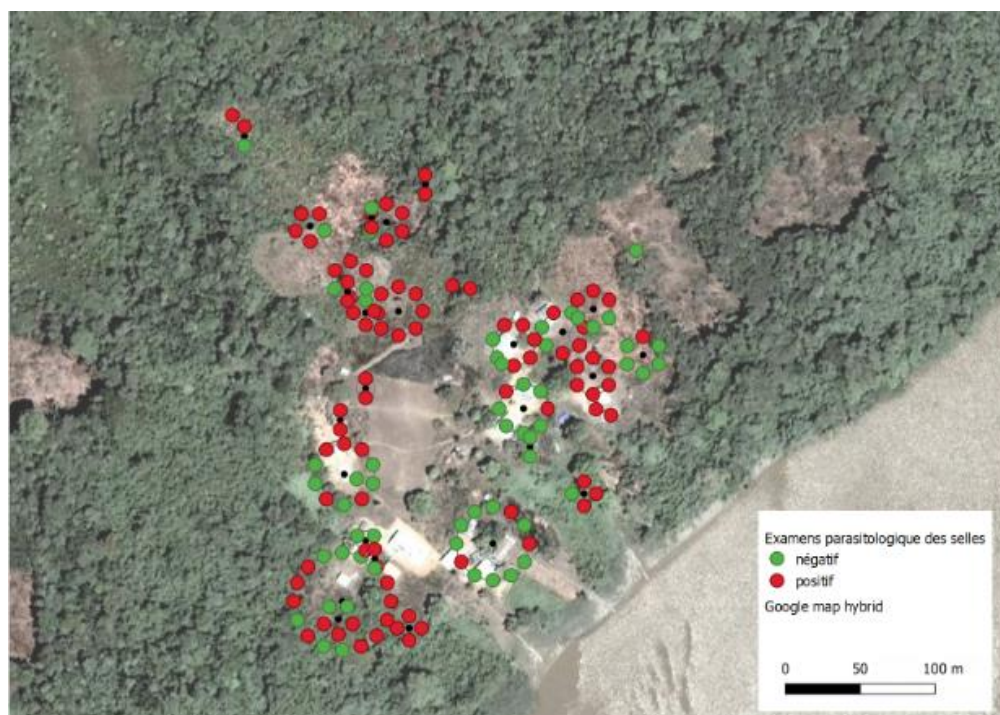


Figure 29 : Répartition géographique globale des patients parasités dans le village de Trois-Palétuviers.

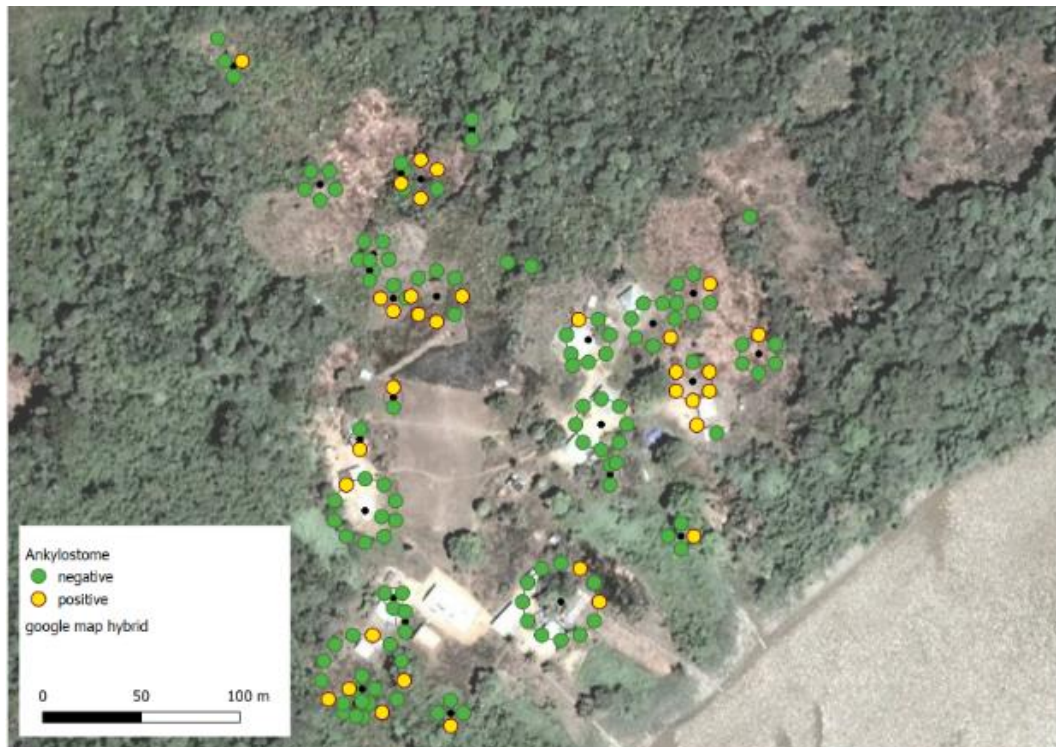


Figure 30 : Répartition géographique des patients parasités par *Necator americanus* ou *Ancylostoma duodenale* dans le village de Trois-Palétuviers.

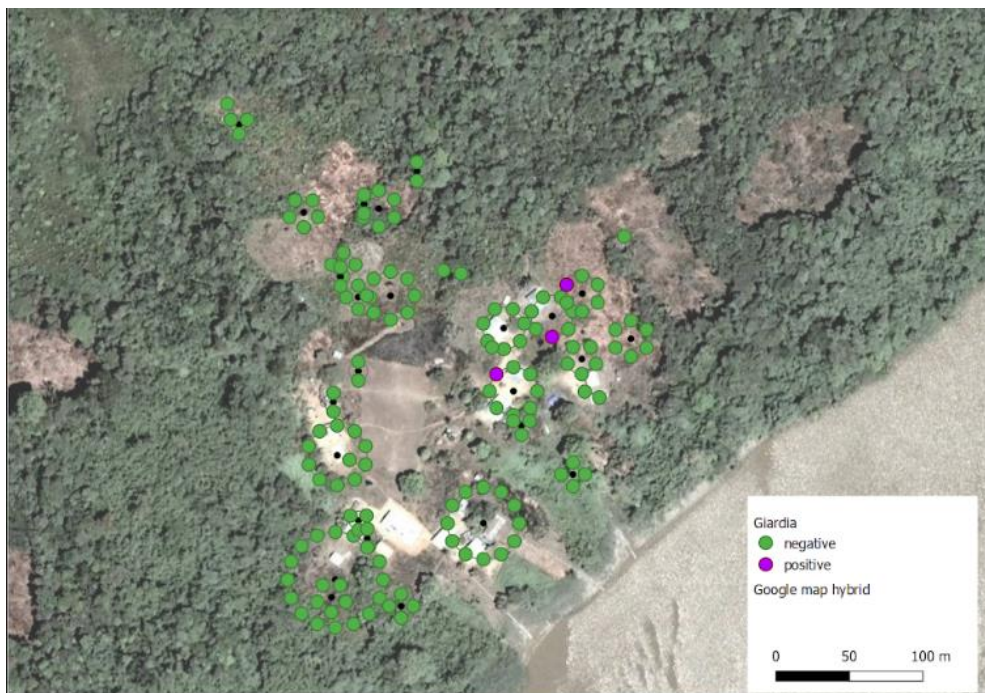


Figure 31 : Répartition géographique des patients parasités par *Giardia intestinalis* dans le village de Trois-Palétuviers.

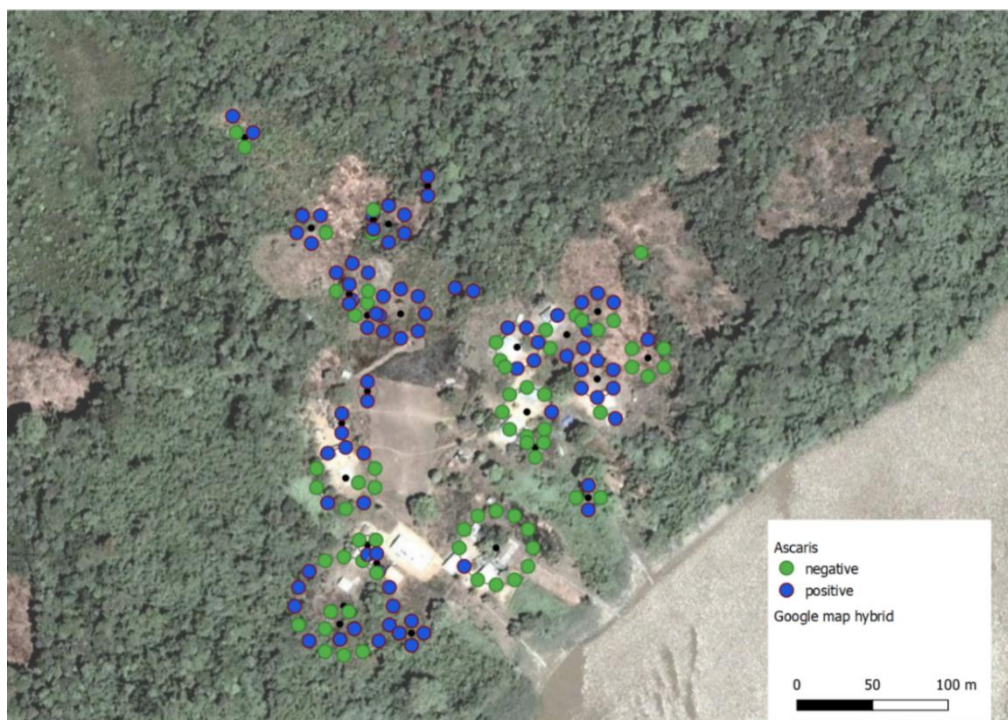


Figure 32 : Répartition géographique des patients parasités par *Ascaris lumbricoides* dans le village de Trois-Palétuviers.

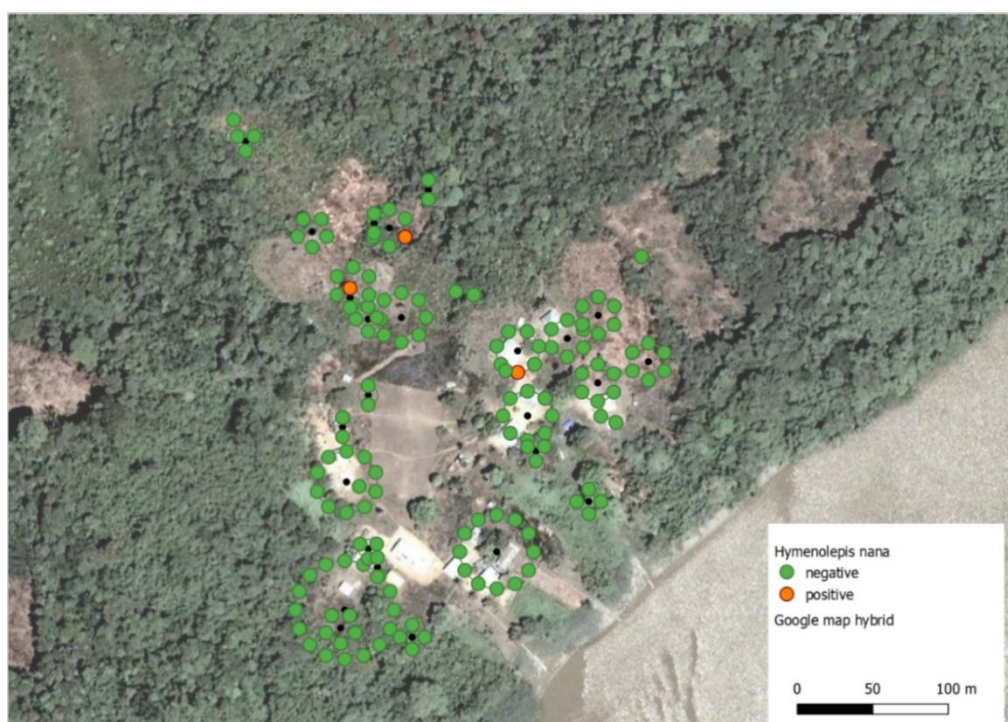


Figure 33 : Répartition géographique des patients parasités par *Hymenolepis Nana* dans le village de Trois-Palétuviers.

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