

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude de la biologie et de l'ultrastructure de Blastocystis Hominis

Querton, Nadine

Award date:
1984

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1984



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ETUDE DE LA BIOLOGIE
ET DE L'ULTRASTRUCTURE
DE BLASTOCYSTIS HOMINIS

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

NADINE
QUERTON

Je voudrais remercier ici le docteur J.M. Jadin d'avoir accepté de promouvoir ce mémoire et de m'avoir prodigué ses conseils judicieux lors de sa réalisation.

Qu'il me soit permis d'exprimer également ma gratitude envers le professeur R. Leloup, qui m'a accueillie dans le laboratoire Interfacultaire de Microscopie électronique, Madame Ch. Chapeau-Devignon, Messieurs Houbion et M. Lombet pour leur disponibilité.

Un merci tout particulier à Madame Lecossois-Duviviers, pour sa collaboration et sa sympathie.

Je remercie également les professeurs M.-Fr. Ronveaux-Dupal et J. Remacle qui m'ont permis l'accès à leur laboratoire.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Mademoiselle M.B. Maton et à Messieurs J.M. Carpentier et A. Matagne qui m'ont apporté leur aide au cours de ce travail.

Je pense aussi à Messieurs M. Cambier, J. Hoyoux et E. Wiame pour leur disponibilité et leur aide technique.

Je remercie enfin tous ceux, qui à leur manière ont participé à la réalisation, la rédaction et l'impression de ce travail.

<u>PLAN.</u>	pages :
<u>INTRODUCTION.</u>	1
A. Généralités.	1
B. Historique.	4
C. Buts du travail.	7
<u>CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES.</u>	8
A. Techniques de microscopie.	8
1. Microscopie optique.	8
2. Microscopie électronique à transmission.	8
3. Microscopie électronique à balayage.	11
B. Techniques de culture.	12
1. Source.	12
2. Milieux.	12
3. Méthodes de culture.	13
4. Méthodes d'enrichissement.	14
<u>CHAPITRE II : RESULTATS.</u>	17
A. Culture.	17
B. Microscopie optique.	21
C. Microscopie électronique à balayage.	25
D. Microscopie électronique à transmission.	26
1. La membrane plasmique.	27
2. La vacuole centrale.	27
3. Le cytoplasme.	28
4. Le noyau.	28
5. L'appareil de Golgi.	29
6. Les mitochondries.	29
7. La vacuole lipidique.	29

8. Le réticulum endoplasmique. 29

9. Inclusions cytoplasmiques. 30

CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSIONS. 31

BIBLIOGRAPHIE. 36

INTRODUCTION.

A. Généralités.

Blastocystis hominis est un hôte unicellulaire du gros intestin humain qui se retrouve en moyenne dans 15 à 20 % du nombre total d'analyses coprologiques courantes d'un laboratoire de biologie clinique en Belgique.

Suivant les conditions de vie, cet organisme peut se présenter sous trois formes : vacuolaire, granulaire et amiboïde (Zierdt 1973).

En général, il n'est présent dans les selles qu'en petit nombre, mais de temps à autre, pour des raisons que l'on ignore encore, il se retrouve en grande proportion dans des selles diarrhéiques.

Dans beaucoup d'ouvrages actuels de parasitologie, Blastocystis hominis est considéré comme "un piège coprologique" à ne pas confondre avec un kyste d'amibe. Il est classé, en général, comme un champignon inférieur.

Blastocystis hominis est un organisme qui vit en anaérobie stricte, la moindre exposition à l'air entraîne la lyse de la cellule.

Des études ont déjà été entreprises (Brumpt 1912, Aragao 1922, Panayotatou 1928, Calderin 1937, Goiffon 1942, Zierdt 1967) afin de déterminer l'éventuelle

pathogénicité de Blastocystis hominis, mais jusqu'à présent, la question n'a pas encore été tranchée. En effet, on ne peut dire avec certitude si la prolifération de Blastocystis hominis est la cause ou la conséquence des troubles divers de l'intestin.

Pour certains, les diarrhées favorisent l'abondance de ce parasite et il n'est pas pathogène (Aragao 1922, Goiffon 1942). Brumpt en 1912, a démontré que l'usage d'un purgatif chez un porteur sain entraîne une augmentation considérable du nombre de Blastocystis hominis.

Pour d'autres (Panayotatou 1928), Blastocystis hominis provoque des troubles intestinaux vraiment sérieux et il sera considéré comme un agent d'infestation intestinal.

Pour appuyer son hypothèse, A. Panayotatou décrit trois cas sérieux d'entérite à Blastocystes avec selles glairo-sanguinolentes qu'elle a pu décrire à l'hôpital Héliénique d'Alexandrie.

En 1937, Caldérin fait une étude analogue à Cuba et réserve son diagnostic considérant qu'un plus grand nombre de cas doivent être étudiés avant de poser l'affirmation de la pathogénicité de Blastocystis hominis.

Il est à noter que dans les pays d'endémie, la fréquence des diarrhées à Blastocystes est plus importante.

Les Blastocystes ont également été étudiés chez des vertébrés à sang froid : Triton marmoratus, Triton cristatus, Salamandra maculosa, Rana esculenta (Alexeieff 1911), chez des vertébrés à sang chaud : souris, cochon d'Inde, chien, chat, cochon, rat, lapin, oiseaux, des singes Cercopithecus rube chez qui on a déterminé Blastocystis cercopitheci qui existe également chez les Cynocéphales et les macaques (Brumpt 1912), chez les invertébrés : Hoemopsis sanguisuga on retrouve Blastocystis sanguisugae.

B. Historique.

La première description de Blastocystis hominis fut faite par Alexeieff en 1911 qui avec Prowazek le considérait comme un kyste de flagellate.

Alexeieff donne le nom de Blastocystis enterocola à une espèce qui vit dans l'intestin de Triton cristatus et qu'il considère comme vivant indifféremment chez l'homme, le rat, les sangsues.

Brumpt en 1912 nie l'existence de kyste de Trichomonas, les classe comme Blastomycètes et les nomme Blastocystis hominis n. sp..

En 1917, Alexeieff considère Blastocystis hominis comme un champignon du genre Blastomyces pendant que d'autres (Lynch 1922, Aragao 1922, Knowles et Das Gupta 1924) le classaient parmi les levures du genre Schizosaccaromyces.

Ciferri et Redaelli en 1938 pensaient que Blastocystis hominis était une algue non pigmentée du genre Pterotheca. En 1967, Zierdt considère qu'il n'est pas acceptable que tant d'études sur Blastocystis hominis conduisent à des conclusions aussi différentes et que sa nature reste une énigme.

Après divers essais de culture, des études en microscopie optique et électronique, en freeze-etching, Zierdt apporte quelques conclusions :

B. Historique.

La première description de Blastocystis hominis fut faite par Alexeieff en 1911 qui avec Prowazek le considérait comme un kyste de flagellate.

Alexeieff donne le nom de Blastocystis enterocola à une espèce qui vit dans l'intestin de Triton cristatus et qu'il considère comme vivant indifféremment chez l'homme, le rat, les sangsues.

Brumpt en 1912 nie l'existence de kyste de Trichomonas, les classe comme Blastomycètes et les nomme Blastocystis hominis n. sp..

En 1917, Alexeieff considère Blastocystis hominis comme un champignon du genre Blastomyces pendant que d'autres (Lynch 1922, Aragao 1922, Knowles et Das Gupta 1924) le classaient parmi les levures du genre Schizosaccaromyces.

Ciferri et Redaelli en 1938 pensaient que Blastocystis hominis était une algue non pigmentée du genre Pterotheca. En 1967, Zierdt considère qu'il n'est pas acceptable que tant d'études sur Blastocystis hominis conduisent à des conclusions aussi différentes et que sa nature reste une énigme.

Après divers essais de culture, des études en microscopie optique et électronique, en freeze-etching, Zierdt apporte quelques conclusions :

- Blastocystis hominis possède des bactéries endosymbiontes.
- Il ne possède pas de paroi, mais une fine membrane.
- La croissance ne se fait in vitro qu'en présence de bactéries.
- Blastocystis hominis ne croît pas sur un milieu pour champignon.
- Blastocystis hominis ne présente ni bourgeonnement, ni prolongements mycéliens.
- La croissance se fait à pH neutre à alcalin.
- La reproduction se fait par fission binaire.
- Il se produit extension et rétraction de pseudopodes.
- Il phagocyte des bactéries et d'autres particules.
- Une croissance maximale s'obtient à une température de 37°C, à température ambiante, la croissance est interrompue.
- Blastocystis hominis est lysé à 4°C, par une solution hyper- ou hypotonique.

Pour Zierdt, toutes ces caractéristiques sont à l'opposée de celles des levures.

Neuf autres articles de Zierdt suivront celui-là qui traiteront de

- axénisation de Blastocystis hominis,
- étude en freeze-etching,
- étude d'une dysenterie à Blastocystis,
- endosymbiose chez Blastocystis hominis,
- étude de la pathogénicité de Blastocystis hominis.

A la suite de ces études, Zierdt conclut que Blastocystis hominis appartient à l'embranchement des Protozoaires, sous-embranchement : Sporozoa, classe : Blastocystea, ordre : Blastocystida, genre-espèce : Blastocystis hominis.

En 1983, Van Saanen et El Achachi Hassan confirment l'opinion que Blastocystis hominis est un protozoaire. Cette opinion n'a pas été acceptée à l'unanimité. Le problème de l'appartenance phylogénétique reste donc entier.

C. Buts du travail.

Suite aux considérations tenues dans cette introduction, il nous a paru intéressant de poursuivre les études déjà entreprises afin d'apporter quelques éléments supplémentaires susceptibles d'élucider : l'appartenance phyllogénétique, l'ultrastructure et la physiologie de Blastocystis hominis.

C. Buts du travail.

Suite aux considérations tenues dans cette introduction, il nous a paru intéressant de poursuivre les études déjà entreprises afin d'apporter quelques éléments supplémentaires susceptibles d'élucider : l'appartenance phyllogénétique, l'ultrastructure et la physiologie de Blastocystis hominis.

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES.

A. Techniques de microscopie.

1. Microscopie optique.

La microscopie photonique nous a permis de suivre les cultures au cours du temps. Nous observons les cellules en déposant une goutte de culture entre lame et couvre-objet.

Nous avons aussi observé des coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine.

Pour suivre l'évolution des cultures, lors des repiquages, nous avons utilisé un microscope Zeiss.

Pour la photographie nous avons utilisé un microscope Reichert Zetopan.

Le colorant employé pour contraster les cellules était le bleu de méthylène 0,1 %.

Nous avons également observé les Blastocystes en microscopie à contraste interférentiel sur un microscope Reichert qui permet de percevoir des détails cellulaires sans devoir recourir à des colorations.

2. Microscopie électronique à transmission.

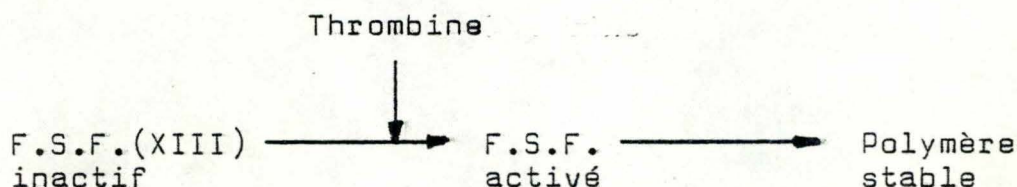
En culture, les cellules de Blastocystes se développent dans le fond du tube et forment avec les bactéries et les divers sédiments fécaux, un culot.

On prélève une partie du culot pour la fixation.

Deux méthodes de fixation ont été choisies :

- a) Le culot est dilué dix fois son volume dans de la glutaraldéhyde puis centrifugé afin de concentrer les cellules en un culot suffisamment compact pour subir, sans se dissoudre, la suite de la fixation.
- b) Pour éviter la centrifugation au cours de la fixation, une seconde méthode a été utilisée. Nous prélevons le culot de la culture dans lequel nous ajoutons du sérum frais et quelques gouttes de Fibrin-Prest Automate[®] (Diagnostica stago). Il se forme alors un précipité qui enchasse les cellules dans un réseau de fibrine.

La réaction est en fait le schéma de la phase III de coagulation



Le facteur XIII stabilise la fibrine.

Ce polymère a l'avantage d'être insoluble dans les fixateurs utilisés : la glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium.

Il est possible de découper le polymère obtenu en morceaux de 1 mm^3 et nous le soumettons à la fixation en supprimant la centrifugation.

Mis à part le départ de la fixation, le reste des opérations se déroule de la même manière :

- Fixateur : Glutaraldéhyde de 2 à 10 % pendant 2 heures à 4°C.
 Pour diluer la glutaraldéhyde, nous avons utilisé différents tampons :
 - P.B.S.
 - tampon phosphate 0.1 M pH 7,2,
 - tampon cacodylate.
- Lavage : On procède à trois lavages de 10 minutes à 4°C pour lesquels nous avons utilisé :
 - P.B.S. - sucrose,
 - tampon phosphate 0,1 M pH 7,2,
 - tampon cacodylate.
- Centrifugation : (pour la méthode a)
- Post-fixation : OsO_4 2,5% dans du tampon phosphate ou dans du cacodylate, pendant une heure à température ambiante.
- Deshydratation : alcool progressif :

50°	1 x 5'
70°	1 x 5'
94°	1 x 5'
100°	2 x 5'
- Inclusion :

Bains : alcool 100° trois fois 20 minutes
 oxyde de propylène trois fois 20 minutes
 oxyde de propylène-épon trois fois 20 minutes

Inclusion : résine complète pendant deux heures à 37° puis une heure à 37° après changement de bain.
- Polymérisation :

37°	12 h.
45°	24 h.
60°	72 h.

Les sections sont effectuées par un ultratome Reichert Austria OMU₃.

- Coloration :

- les coupes semi-fines sont colorées au Bleu de Toluidine
- les ultra-fines sont colorées sur grille par le citrate de plomb utilisé en double coloration avec l'acétate d'uranyle.

Les grilles sont examinées au microscope électronique à transmission Philips EM 301.

3. Microscopie électronique à balayage.

Nous ajoutons quelques gouttes de culture dans de la glutaraldéhyde 2,5 % pendant deux heures à 4°C.

On fait passer cette solution sur une membrane filtrante pourvue de pores de 7 µm de diamètre qui laisse passer les résidus inférieurs à cette taille et permet ainsi d'éliminer un grand nombre de bactéries et autres particules de la préparation de Blastocystis hominis.

A l'aide d'une pompe filtrante, le fixateur sera éliminé. On le remplace alors par du tampon phosphate qui lave les cellules, puis toujours à l'aide de la pompe filtrante on procède à la déshydratation dans l'acétone :

30 %	10 minutes
50 %	10 minutes
70 %	10 minutes
90 %	10 minutes
100 %	10 minutes.

Ces filtres sont soumis à la dessiccation par passage au point critique (appareil à CO₂) et ombrés à l'or par sputtering à l'aide d'un appareil Balzers.

L'étude et les microphotos ont été faites sur un microscope à balayage Jéol J.S.M. 35.

B. Techniques de culture.

1. Source.

Les selles qui contenaient un grand nombre de Blastocystes étaient sélectionnées lors des examens de routine de recherche de parasites.

Vingt et une souches ont été étudiées et dix-neuf souches ont été mises en culture.

2. Milieux.

a) Milieux liquides.

- thioglycolate pré-réduit + 20 % de sérum humain frais.
- R.P.M.I. + 20 % de sérum humain frais + extrait de muqueuse intestinale de porc.

L'extrait de muqueuse intestinale de porc est une préparation personnelle à partir d'un intestin grêle de porc qui est la partie la plus riche en mucus.

b) Milieux biphasiques.

Ce milieu comprendra une couche solide qui sera toujours constituée de sérum coagulé de cheval en plan incliné (I.P.P.). Sur cette phase solide, nous avons

utilisé différentes phases liquides :

- thioglycolate pré-réduit + 20 % de sérum humain frais,
- milieu de Hank's (I.P.P.) + 20 % de sérum humain frais,
- milieu de Hank's + 20 % de sérum humain frais
+ extraits de muqueuse intestinale de porc,
- R.P.M.I. + 20 % de sérum humain frais
+ extraits de muqueuse intestinale de porc.

3. Méthodes de culture.

Les cultures sont effectuées dans des tubes munis d'un capuchon à visser.

Deux moyens ont été utilisés :

- dilution d'une noisette de selle dans des tubes de culture préconditionnés à 37°C.
- la selle est diluée dix fois son volume dans la phase liquide puis filtrée sur tamis afin d'éliminer les gros résidus alimentaires.

Les tubes de sérum coagulé conditionné à 37°C sont ensemencés à l'aide de cette solution.

Une couche d'huile minérale stérile est déposée à la surface de la phase liquide pour éviter le contact du milieu avec l'air.

Les cultures obtenues dans ce milieu, à partir de matières fécales, sont dites "polyxéniques" parce qu'elles contiennent, outre Blastocystis hominis, des repré-

sentants de la flore bactérienne de l'intestin (cultures mixtes).

En vue de limiter la population bactérienne qui risquerait d'inhiber le développement des Blastocystes, deux antibiotiques ont été ajoutés : ampicilline 40.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et streptomycine 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pour compenser la perte nutritive, nous ajoutons des bactéries collibacilles tuées par la chaleur à 70°C.

Les tubes sont mis à incuber dans une jarre contenant des sachets générateurs d'atmosphère anaérobie (BBL Gas Pak anaerobique systems $\text{H}_2 + \text{CO}_2$). La jarre est placée dans une étuve à 37°C.

Les cultures sont repiquées tous les 6-7 jours après observation au microscope optique de l'état de la culture.

Afin d'éviter toute confusion entre Blastocystis hominis et un kyste d'amibe en microscopie électronique, les selles contenant des amibes ne sont pas utilisées pour les cultures.

4. Méthodes d'enrichissement.

Ces méthodes ont pour but de séparer les cellules parasitaires des multiples autres constituants des matières fécales de manière à concentrer les parasites dans un faible volume et à faciliter l'examen microscopique.

Les particules sont séparées par sédimentation à travers un gradient de densité dont la partie légère est formée par les matières fécales diluées dans une solution physiologique et la partie lourde par un mélange de deux solutions de Ficoll[®] et de metrizoate de sodium.

Le Ficoll[®] est un polymère d'hydrate de carbone. Son poids moléculaire est de 400.000. Sa pression osmotique est très faible, même à haute concentration. Le Ficoll[®] est soluble dans l'eau. Ses solutions aqueuses peuvent être autoclavées.

Ce produit est inerte vis-à-vis des éléments cellulaires.

Le metrizoate de sodium est une substance triiodée utilisée comme produit de contraste en radiologie. Il est mieux connu sous le nom d'Urographine[®], de Ronpacon[®] ou d'Isopaque[®].

On prépare une solution aqueuse d'Isopaque[®] à 33,9 % et une solution aqueuse de Ficoll[®] à 9 %.

On mélange 10 volumes de la solution d'Isopaque[®] avec 24 volumes de la solution de Ficoll[®].

Dans un tube à centrifuger, on dépose 5 ml de la solution Ficoll-Isopaque au-dessus de laquelle on ajoute prudemment 2 ml de solution fécale.

Cette préparation est soumise à une centrifugation à 400 g pendant 10 minutes.

Après la centrifugation, les différentes couches se présentent de la manière suivante : le culot est formé des autres constituants des matières fécales, au-dessus vient la couche de Ficoll surmontée de la solution physiologique.

A l'interface : solution physiologique - Ficoll se retrouvent les Blastocystes.

CHAPITRE II : RESULTATS.

A. Culture.

Nous avons expérimenté différents milieux. (voir page 18)

L'utilisation d'un milieu liquide de thioglycolate nous donne des résultats médiocres, les cellules dégénéralent au bout de trois jours.

Nous avons alors pensé à utiliser un milieu biphasique dont la phase liquide était encore le thioglycolate et la phase solide du sérum coagulé de cheval. Les résultats obtenus après l'utilisation de ce milieu furent légèrement meilleurs; nous parvenions alors à conserver les cellules en vie pendant une semaine et demi.

La substitution du thioglycolate par le milieu de Hank's tout en conservant la phase solide nous a permis de garder les cellules en culture un mois, soit le temps de quatre repiquages mais au quatrième repiquage, les cellules présentent des signes de dégénérescence, diminution du volume, déformation de la forme cellulaire.

Il nous a semblé qu'un milieu aussi proche que possible du milieu intestinal serait favorable au développement cellulaire. L'intestin de porc est celui parmi les animaux domestiques, qui du point de vue physiologique, se rapproche le plus de celui de l'homme.

Nombre de souches.	Milieu utilisé	Durée de vie (jours).
2	Thioglycolate	3
3	Thioglycolate Sérum coagulé de cheval	10
4	Milieu de Hank's Sérum coagulé de cheval	30
4	Milieu de Hank's Extraits de muqueuse intestinale Sérum coagulé de cheval	45
6	R.P.M.I. 1640 + 25 mM HEPES Extraits de muqueuse intestinale Sérum coagulé de cheval	60

TABLEAU 1.

Un extrait de muqueuse intestinale de porc dilué dans du milieu de Hank's fût donc préparé et son utilisation nous permit de conserver les cultures un mois et demi.

Une dernière amélioration fût apportée grâce à l'utilisation de milieu R.P.M.I. 1640 + 25 mM HEPES comme diluant de l'extrait de muqueuse intestinale.

Les cultures obtenues sur ce milieu nous donna les meilleurs résultats, il nous a permis de cultiver les cellules sans axénisation et dans les meilleures conditions pendant deux mois, soit environ neuf repiquages.

Les résultats obtenus dans les milieux contenant des extraits de muqueuse intestinale en présence ou en l'absence de la phase solide de sérum coagulé de cheval furent très variables, selon la souche.

Une adjonction de sérum à la culture produit toujours un effet positif quelque soit le milieu surtout si ce sérum provient d'une femme enceinte et qui contient une certaine proportion d'hormones de croissance.

La croissance dépend également de la richesse initiale de la selle en Blastocystes. On peut constater que si l'on initialise une culture à partir d'une selle qui au microscope montre moins de 10 cellules par champ, celle-ci régresse et meurt avant le premier repiquage.

La dilution de la selle dans le milieu de culture suivie de sa filtration, élimine un grand nombre de résidus alimentaires et facilite l'observation en microscopie. La filtration de la selle sur quatre couches de gaze ne retient pas les Blastocystes.

L'ensemencement des milieux préconditionnés à 37°C est indispensable pour un bon démarrage de la croissance. La couche d'huile minérale que l'on déposait à la surface du milieu a été abandonnée car son utilisation n'apportait pas de résultats sensibles et ne faisait que gêner l'observation en microscopie optique.

Le pH des cultures se maintient aux environs de 7-8.

Les bactéries rencontrées sont en majorité : Escherichia coli, Klebsiella s.p., Enterobacter hafniae, Proteus vulgaris, des bactéries de la flore de Veillon, Bactéroïdes fragilis, Streptococcus du groupe D et Clostridium perfringens.

L'état de la selle n'est pas, contrairement à ce que l'on pourrait croire, un critère de richesse; les selles riches en Blastocystes ne sont pas toujours diarrhéiques mais bien souvent de consistance légèrement molle ou pâteuse.

La méthode d'enrichissement sur gradient Ficoll-Isopaque fut un échec.

Les cellules se lysent lors de la centrifugation et une diminution de la vitesse et du temps de centrifugation ne permet plus de séparer les différents constituants. Toutes les méthodes physiques et physico-chimiques concentrant les parasites par centrifugation sont donc à éliminer vu l'extrême fragilité de Blastocystis hominis.

B. Microscopie optique.

En observant les cultures, nous constatons que la morphologie de Blastocystis hominis varie grandement par la taille, la forme et la cytologie.

Si nous suivons chronologiquement l'évolution des cultures au cours du temps, nous observons que dans des selles fraîchement émises ainsi qu'en début de culture, on retrouve la forme vacuolaire et quelques formes amiboïdes.

Par la suite, on voit apparaître, après 5 à 6 jours, des formes granulaires qui au bout de quelques jours libèrent de petites cellules (fig. 9, 13, 14, 15).

Pour trois souches, nous avons vu apparaître, après quelques jours de culture, des formes vacuolaires géantes de 60 à 80 μm . (fig. 3, 4, 5, 6). Ces formes ont la même morphologie que les formes vacuolaires courantes, mais la taille est considérablement augmentée.

La forme vacuolaire prédomine tout au long de la culture et jusqu'au septième ou huitième repiquage. Ensuite, un nombre croissant de formes amiboïdes apparaît dans la culture et ceci jusqu'à la dégénérescence totale des cellules.

Cette dégénérescence se traduit par la lyse, la rétraction et la perte de réfringence des cellules (fig. 16 et 17).

Signalons aussi un fait rare : nous avons remarqué que certains Blastocystes montraient parfois de courts prolongements cycloplasmiques. (fig. 13, 20, 25).

Description des différentes formes.

La forme vacuolaire.

Elles ont une taille qui varie entre 6 et 40 μm de diamètre. La forme est généralement ronde, une grande vacuole occupe le centre, repousse le cytoplasme avec ses organites vers la périphérie qui forme donc un anneau tout autour de la vacuole ce qui donne à la cellule une allure de bague à chaton (fig. 1 à 8).

Dans le cytoplasme périphérique nous observons un nombre variable de noyaux ronds, de nombreuses mitochondries que l'on distingue sous forme de petits bâtonnets réfringents.

La vacuole est optiquement translucide (fig. 1 et 2) mais présente parfois de fines granulations dans une partie de la vacuole; ces granulations finissent par occuper la totalité du volume vacuolaire et grossissent progressivement. A la fin du développement de ces granules, il n'est plus possible de faire la distinction entre la forme vacuolaire à contenu granuleux et la forme granulaire (fig. 13, 14, 15).

Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, une forme vacuolaire géante de 60 à 80 μm peut parfois être observée (fig. 3 à 8).

La forme vacuolaire se divise par fission binaire. La cellule s'allonge, un étranglement apparaît de chaque côté et sépare en se prolongeant deux cellules filles (fig. 8, 10, 11, 12).

L'utilisation du bleu de méthylène comme colorant nous permet de bien distinguer la limite entre le cytoplasme formant une bande bleu foncé et la vacuole qui reste pâle. Le noyau et les mitochondries sont nettement colorés par le bleu de méthylène (fig. 18, 19, 20 et 21).

La microscopie optique à contraste interférentiel (méthode de Nomarski) nous permet de visualiser les détails sans devoir recourir ni au diaphragme, ni à la coloration. Les différences d'indice de réfraction et d'épaisseur au sein de la préparation sont traduits par le système optique en couleurs interférentielles ou en un contraste noir et blanc.

Ce système nous permet de visualiser la vacuole centrale, la bande cytoplasmique ainsi que les noyaux qui s'y trouvent et les mitochondries (fig. 22 à 25).

La forme granulaire.

Elles ont une forme soit sphérique, soit irrégulière et une taille qui varie de 20 à 70 μm .

La vacuole centrale est bourrée de granules sphériques qui ont soit la même taille, soit des tailles très hétérogènes.

Le cytoplasme est repoussé vers l'extérieur et comprend l'ensemble des organelles (fig. 9).

La forme amiboïde.

Ses formes ont un contour irrégulier.

La taille de ces cellules est petite par rapport aux deux autres formes et varie entre 7 et 20 μm (fig. 16 et 17).

Cette cellule ne présente pas de vacuole.

Figures 1 et 2 : Formes vacuolaires de Blastocystis
hominis (sans coloration, x 576).

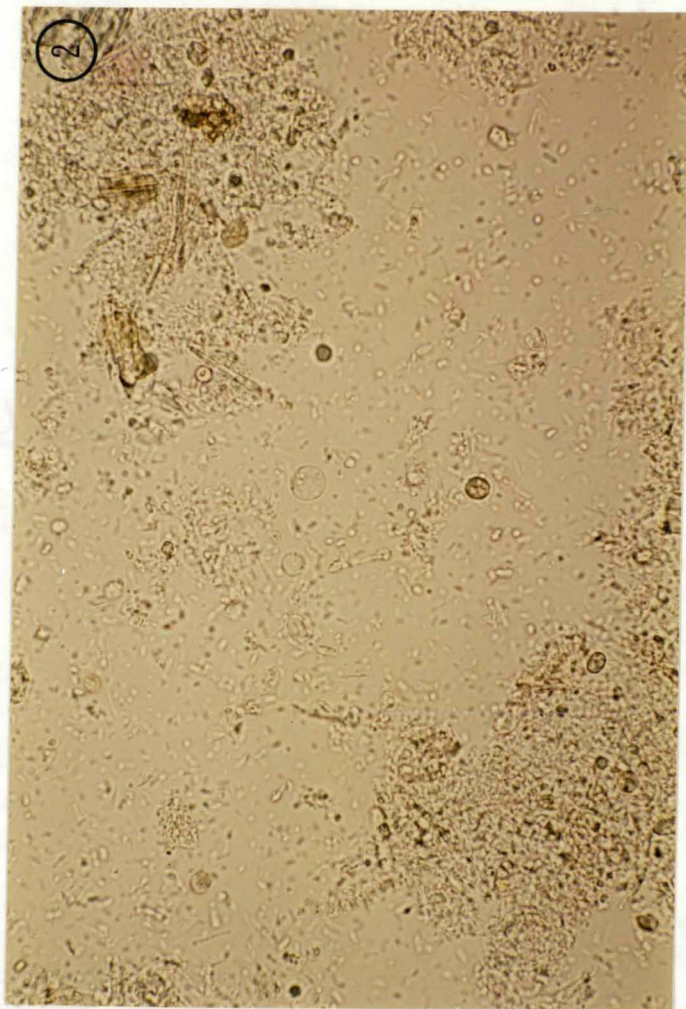
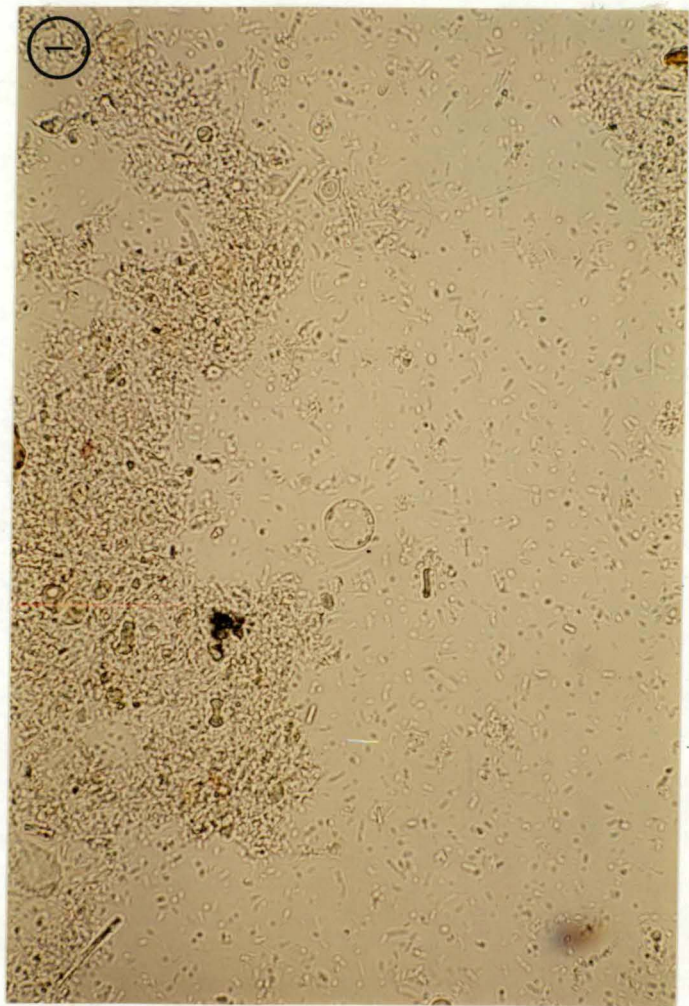


Figure 3 : Deux formes vacuolaires.

La cellule du haut est une forme géante.

(Coupe semi-fine, bleu de toluidine, x 576).

Figures 4 et 5 : Formes vacuolaires géantes.

On distingue la vacuole centrale, la fine bande cytoplasmique, le noyau, les mitochondries et autres éléments.

(Coupe semi-fine, bleu de toluidine, x 576).

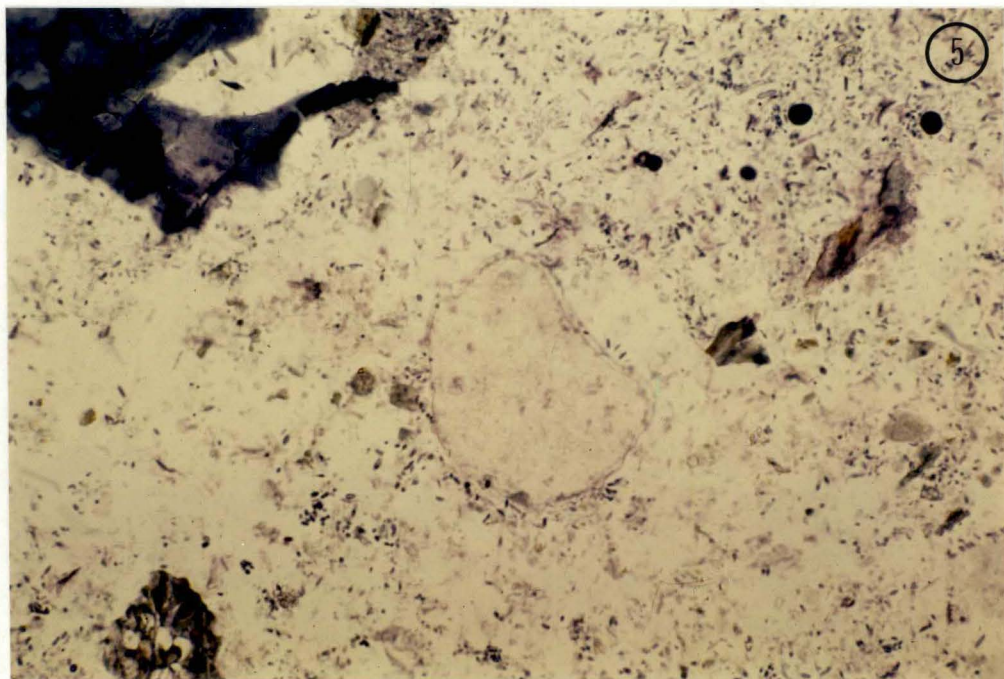
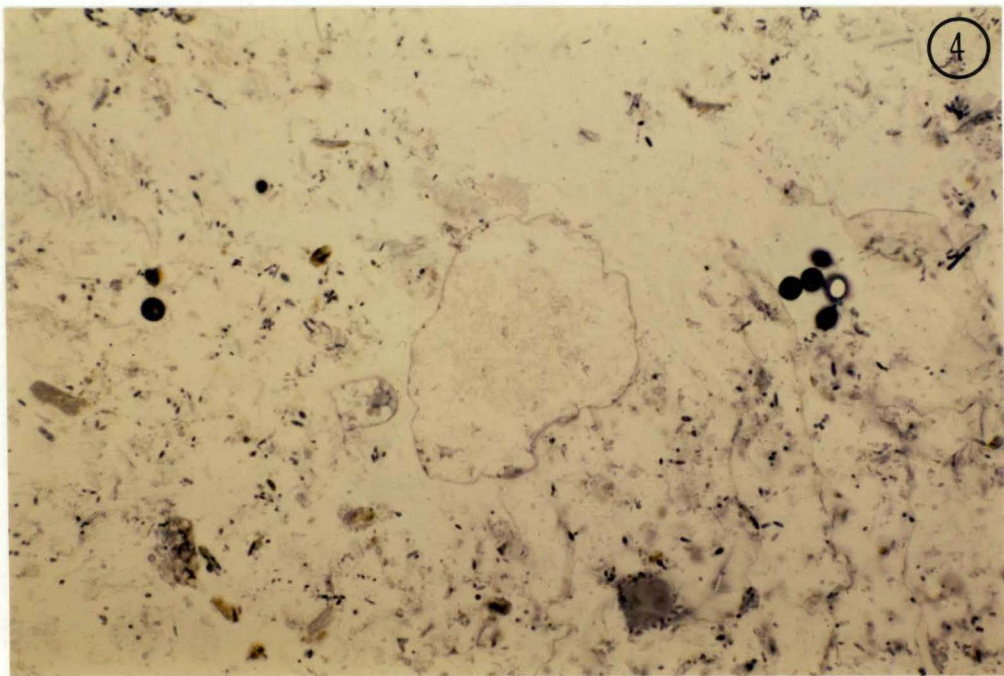
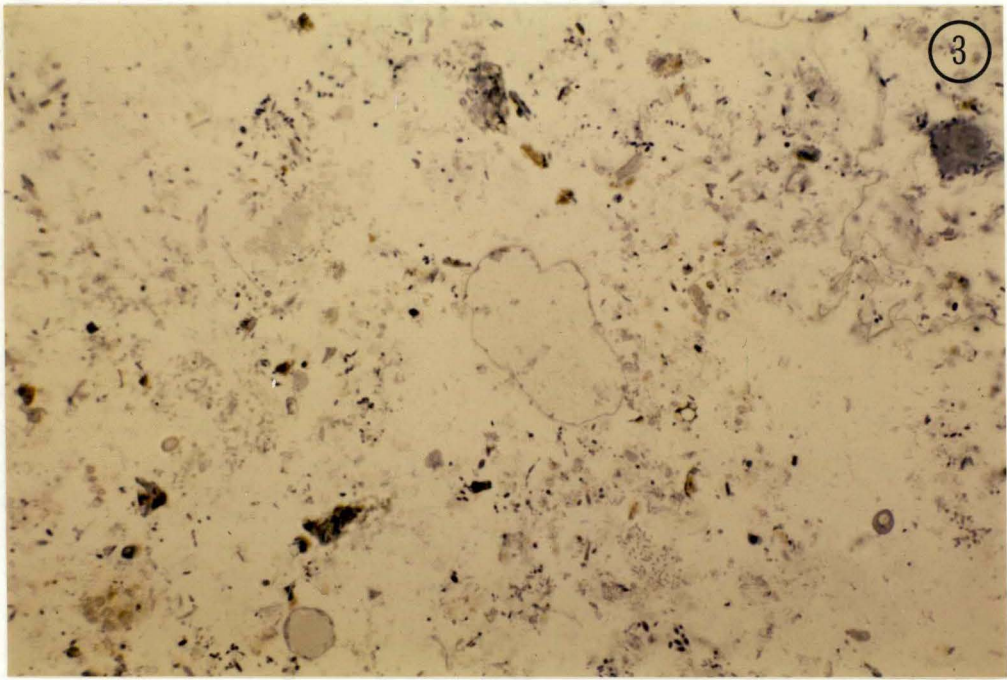


Figure 6 : Forme vacuolaire géante dans laquelle on peut distinguer nettement les nombreuses mitochondries dans la bande cytoplasmique. (Coupe semi-fine, bleu de toluidine, x 576).

Figure 7 : Forme vacuolaire géante dans laquelle le noyau est bien visible et une vacuole lipidique fait saillie dans la vacuole centrale. (Coupe smi-fine, bleu de toluidine, x 576).

Figure 8 : Forme vacuolaire géante en début de phase de division, un étranglement se marque de chaque côté de la cellule. (Coupe semi-fine, bleu de toluidine, x 576).

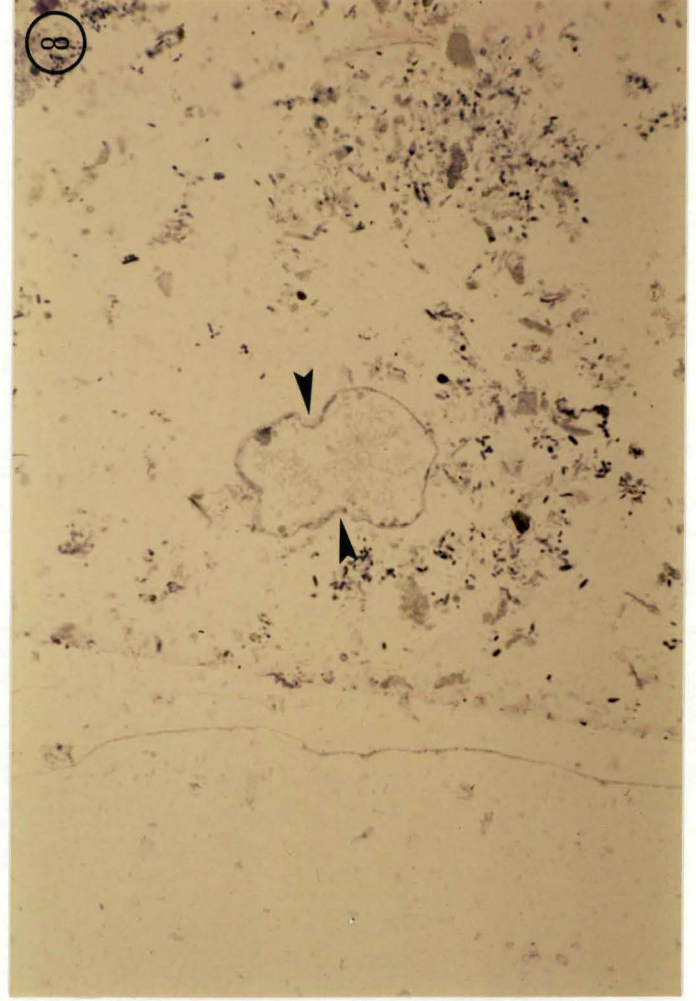
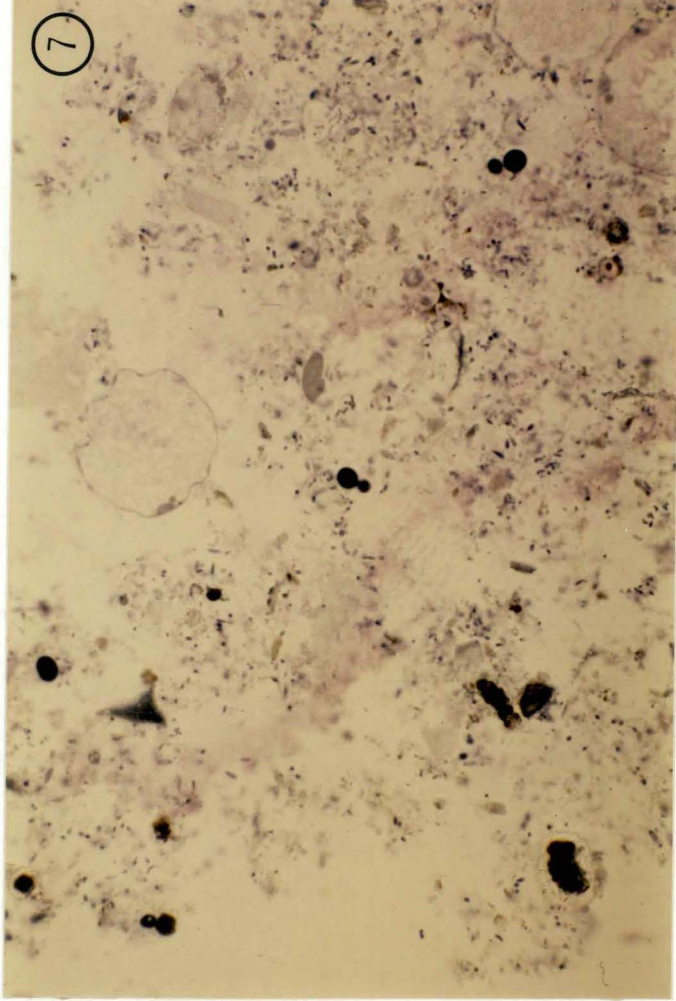
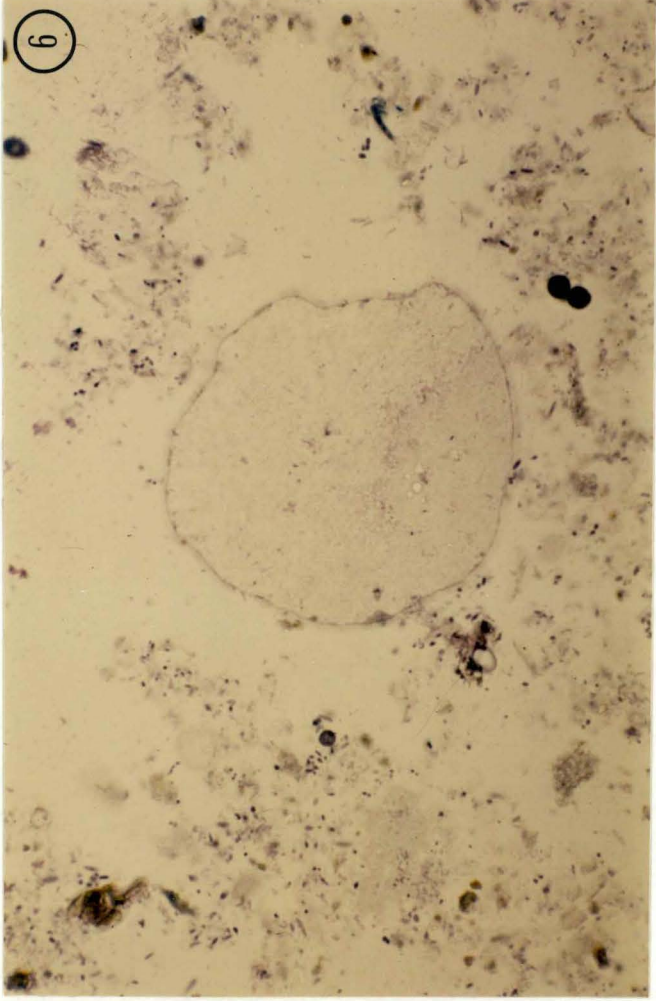
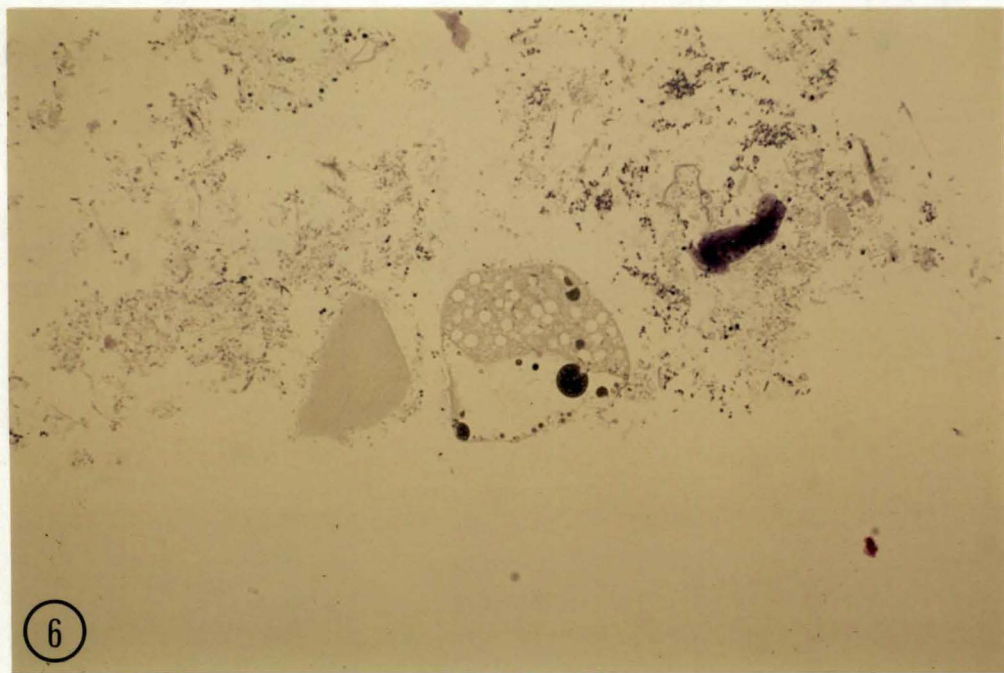


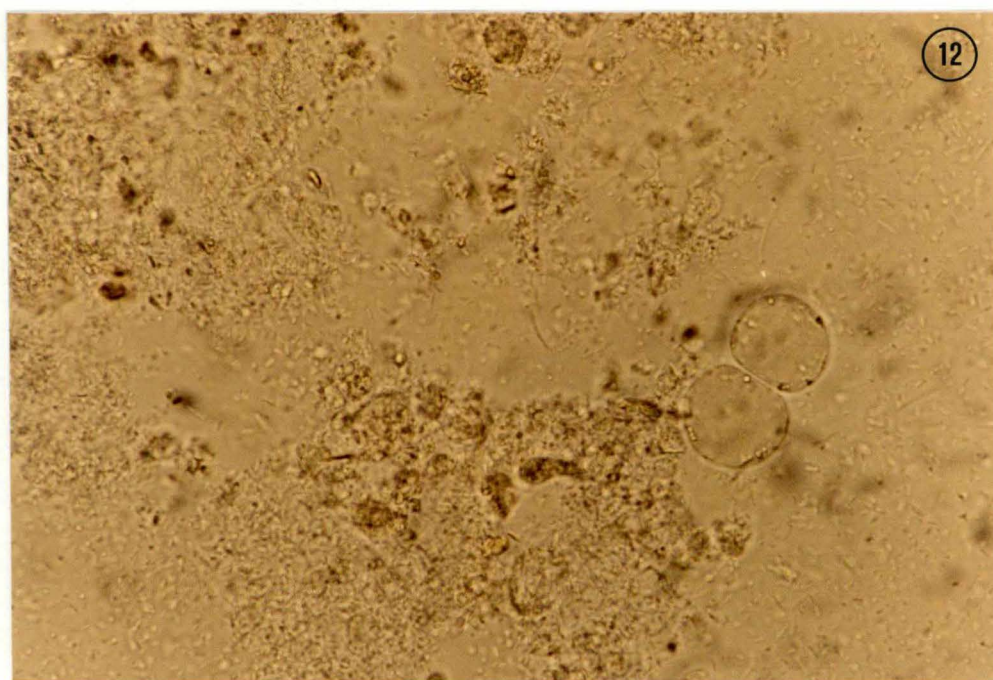
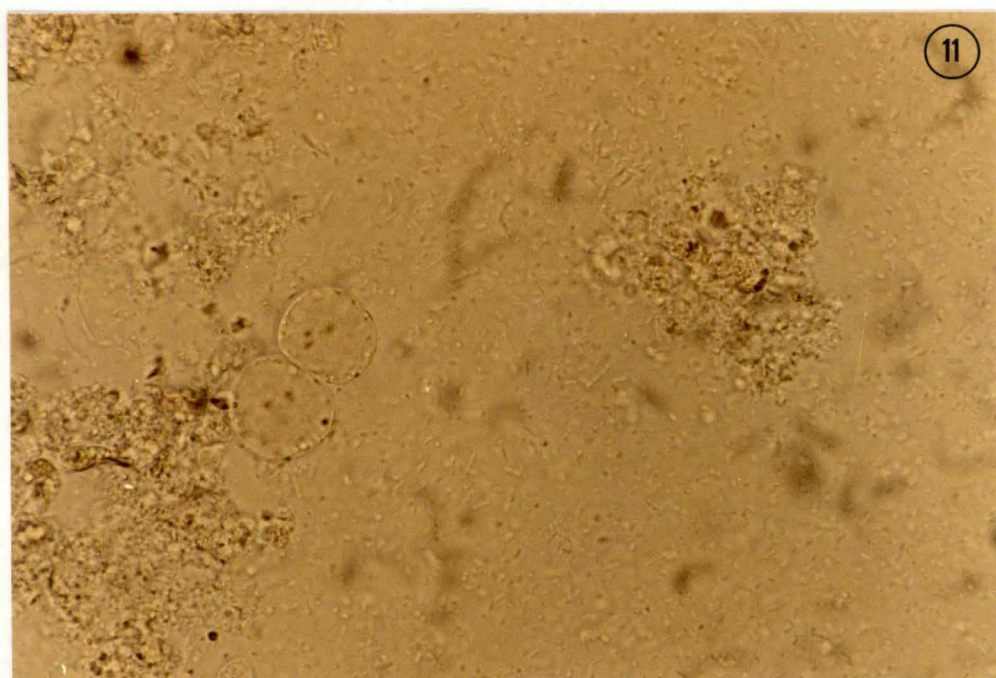
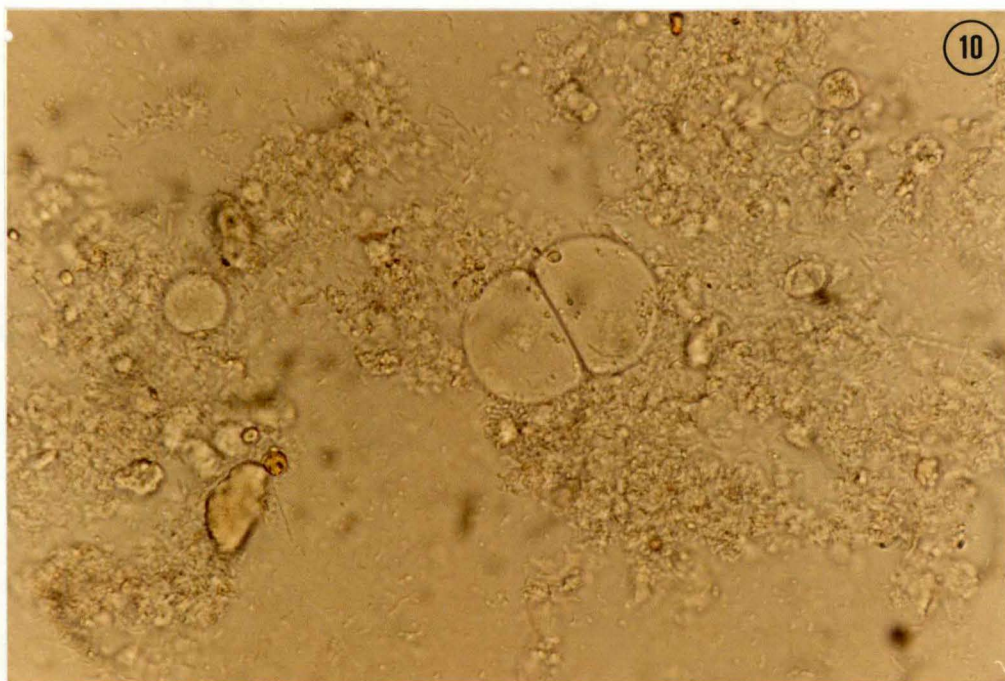
Figure 9 : Forme granulaire dont la vacuole centrale
est remplie de granules.
(Coupe semi-fine, bleu de toluidine, x 576).



Figures 10, 11 et 12 : Formes vacuolaires à différents stades de la division binaire.

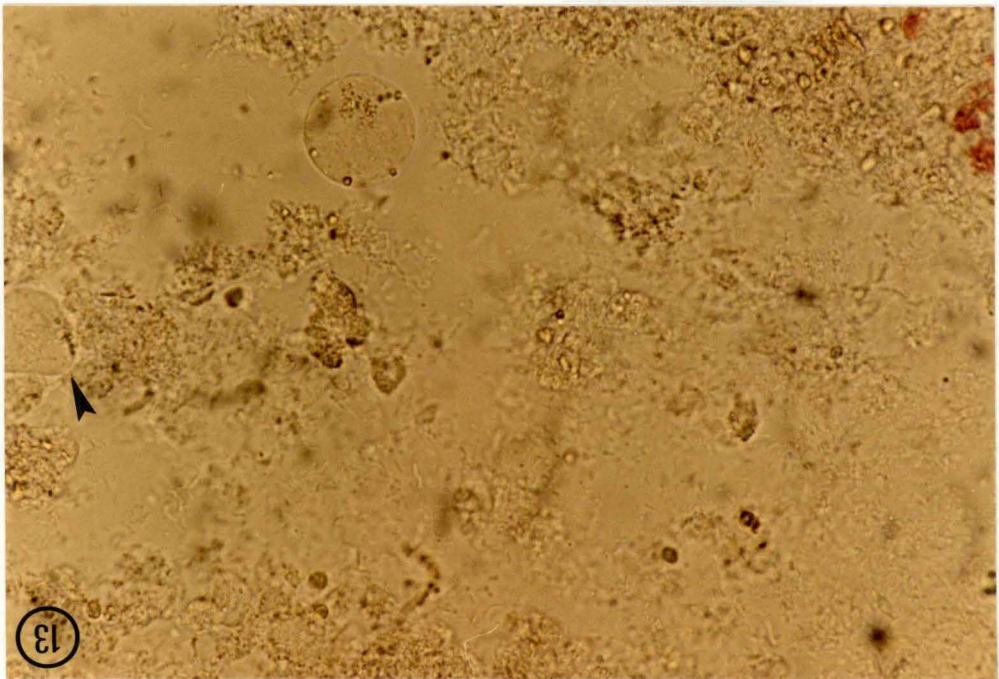
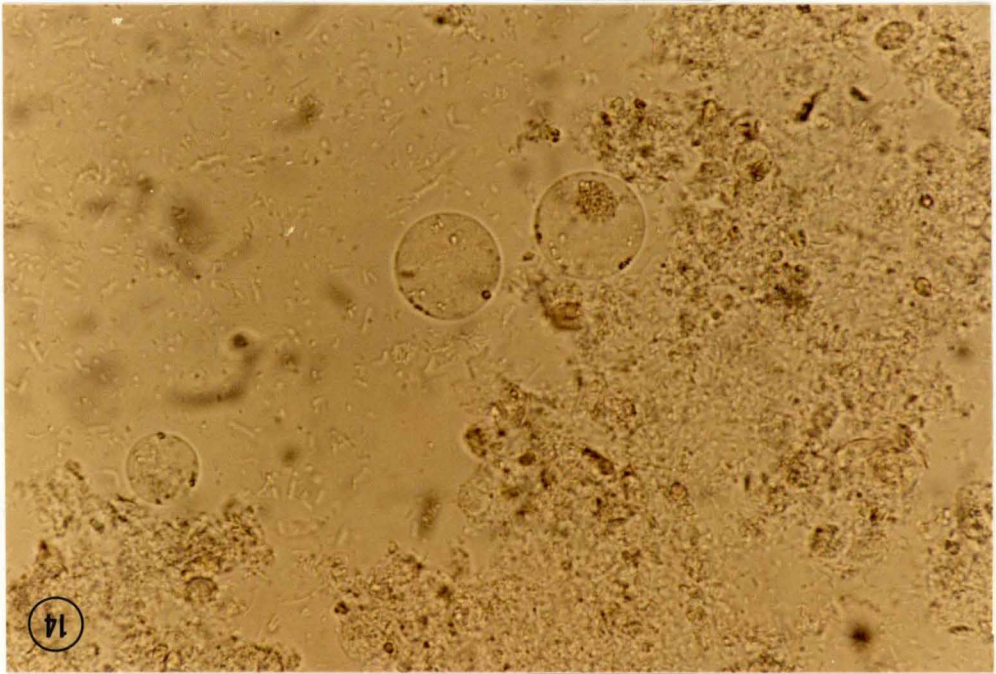
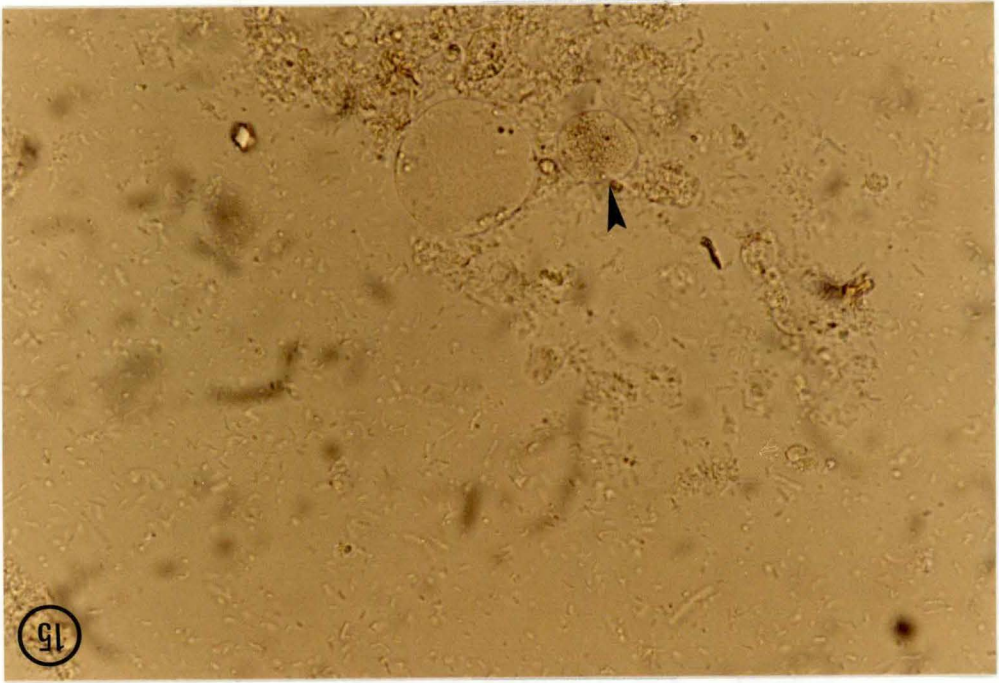
En 10, on remarque nettement le noyau dans le cytoplasme de la cellule supérieure. Les mitochondries se présentent sous la forme de petites sphères ou bâtonnets réfringents.

(sans coloration, x 672).



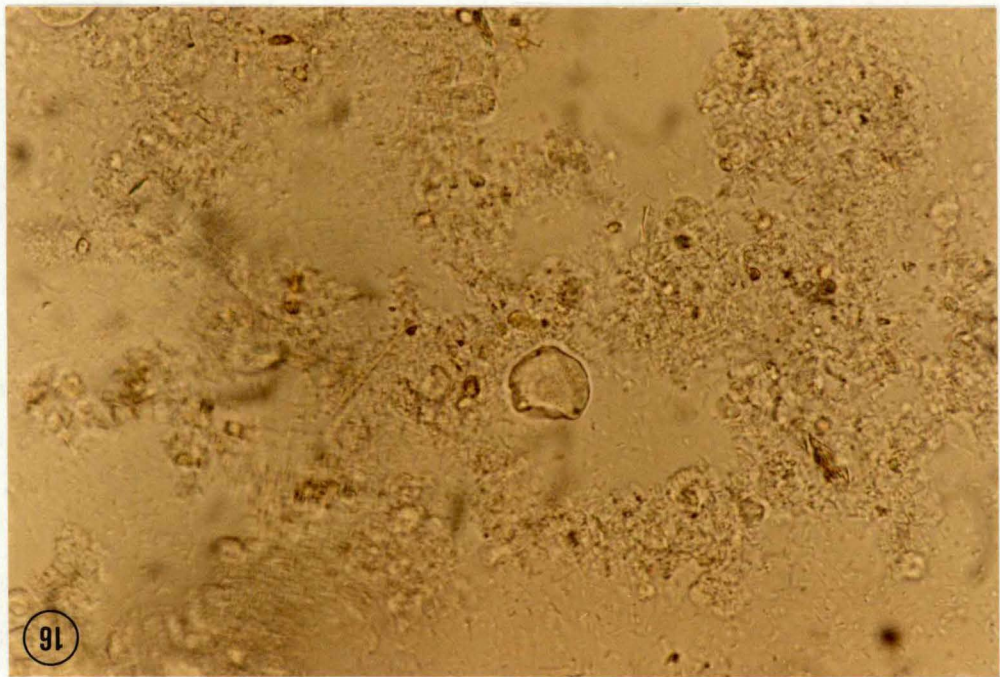
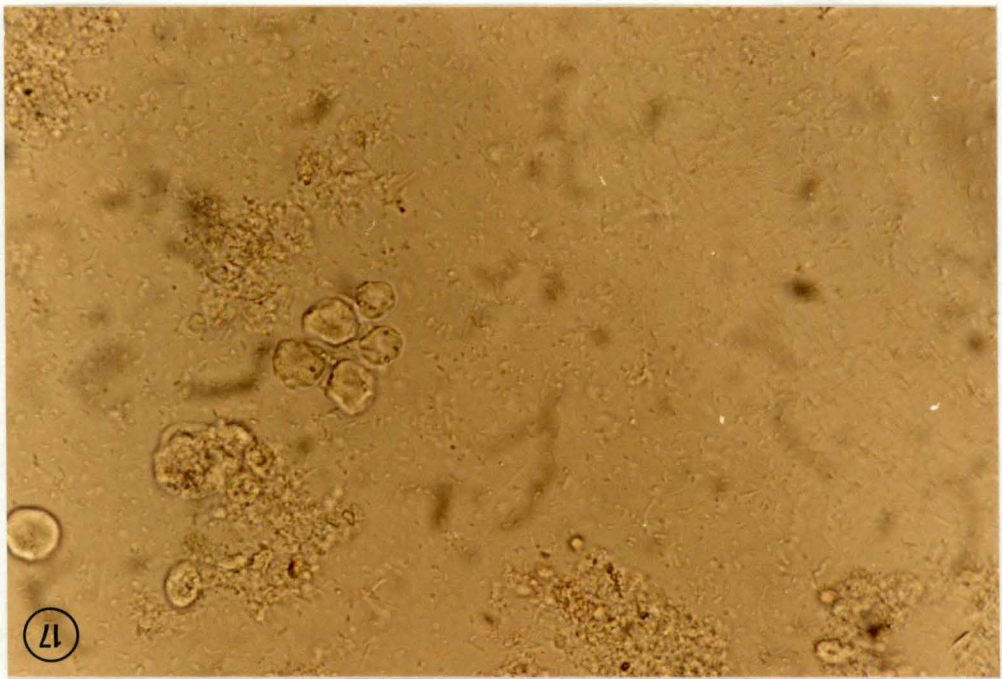
Figures 13, 14 et 15 : Formes vacuolaires à différents stades d'évolution quantitative de la granulation.

En 13, la forme vacuaire à l'extrême droite présente un court prolongement cytoplasmique. (sans coloration, x 672).



Figures 16 et 17 : Formes amiboïdes.

(sans coloration, x 672).



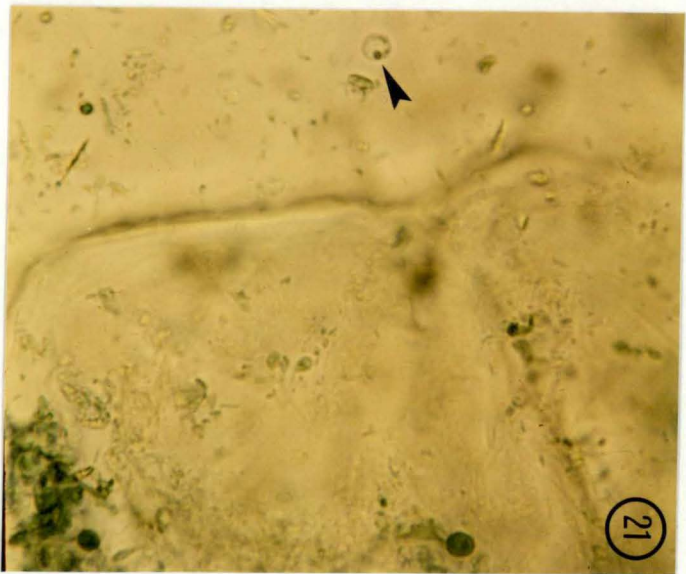
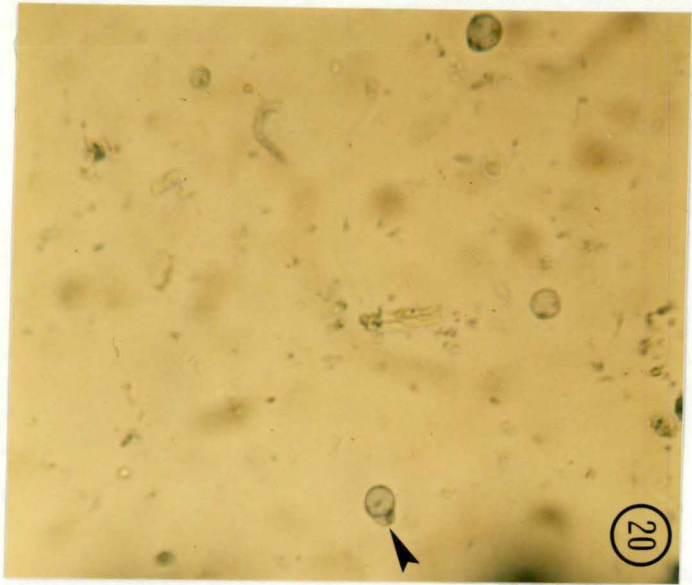
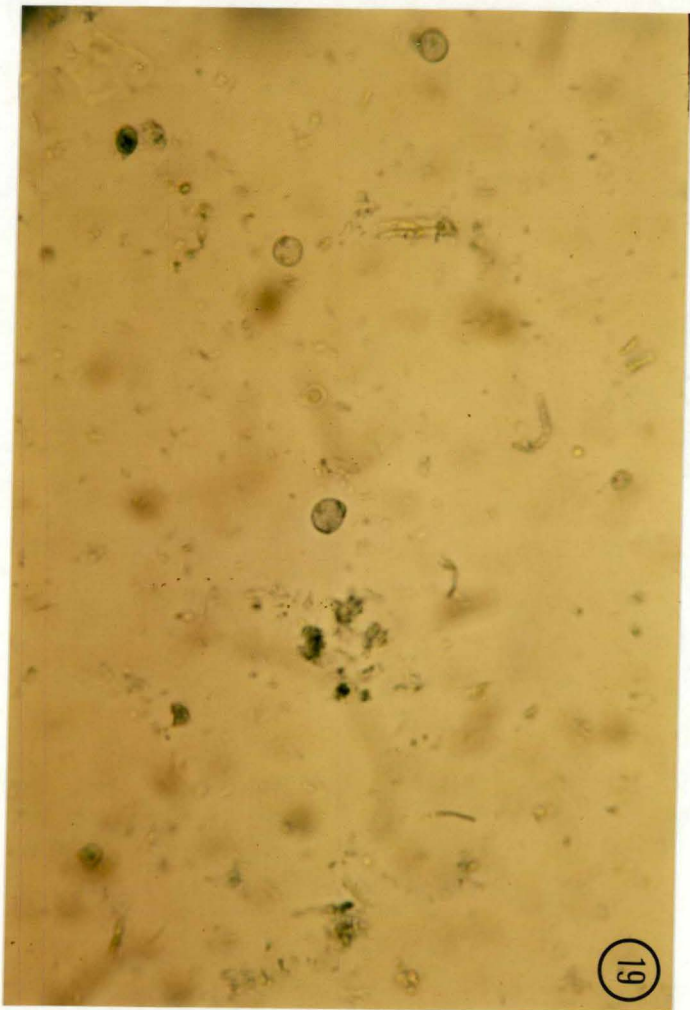
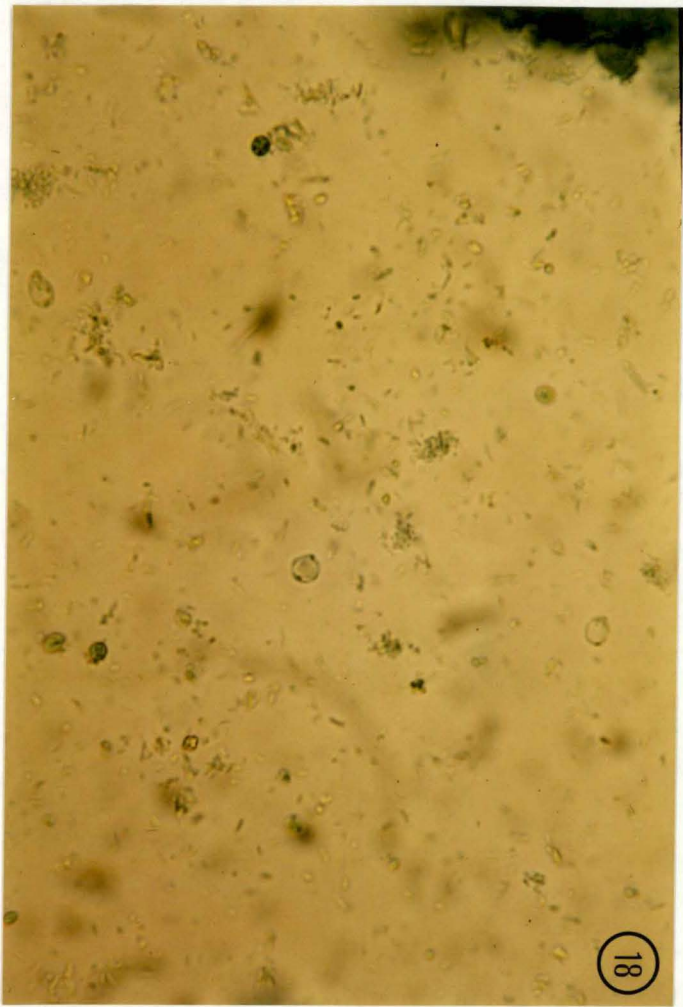
Figures 18, 19, 20 et 21 :

Formes vacuolaires.

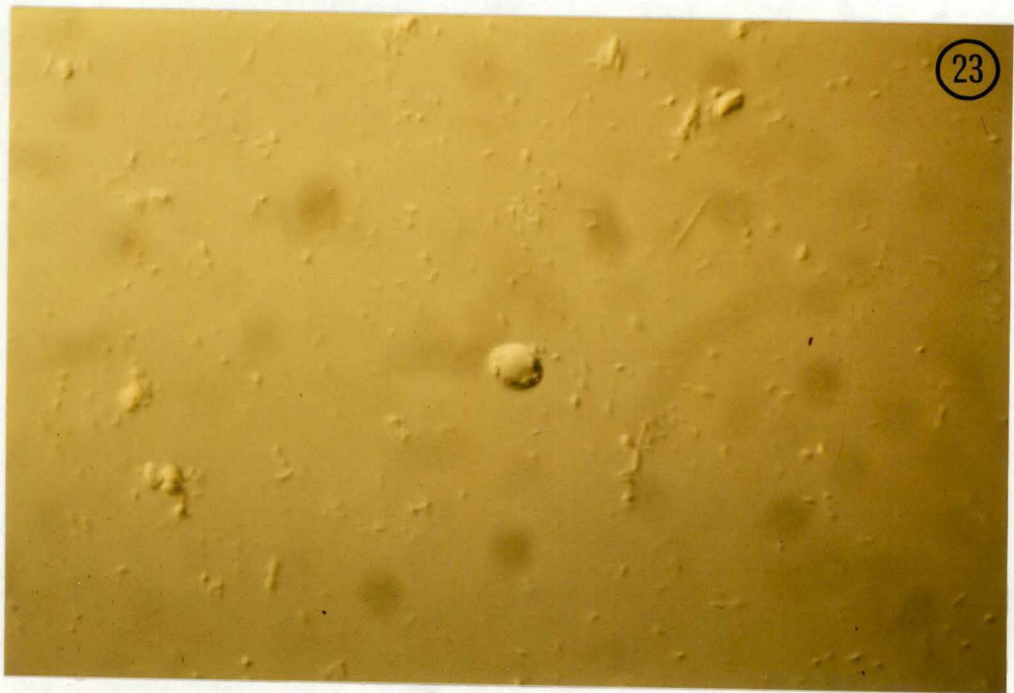
En 20, la cellule de droite présente un court prolongement cytoplasmique.

En 21, le noyau est nettement visible sur le dessus de la cellule.

(bleu de méthylène, x 576).



Figures 22 et 23 : Formes vacuolaires dans lesquelles on distingue les noyaux et les mitochondries en périphérie et la vacuole centrale.
(contraste de phase interférentiel, x 576).



Figures 24 et 25 : Formes vacuolaires, la bande cytoplasmique recouvrant la vacuole laisse apparaître les noyaux et les mitochondries.
(contraste de phase interférentiel, x 576).



24



25

C. Microscopie électronique à balayage.

La microscopie électronique à balayage nous a permis d'observer l'aspect externe de Blastocystis hominis.

Cet organisme présente des formes et des dimensions aussi variées qu'en culture : uniformément sphérique (fig. 26 à 32), en croise (fig. 3~~9~~³), aplaties et lobulées (fig. 34 et 35). La surface de la cellule est généralement rugueuse.

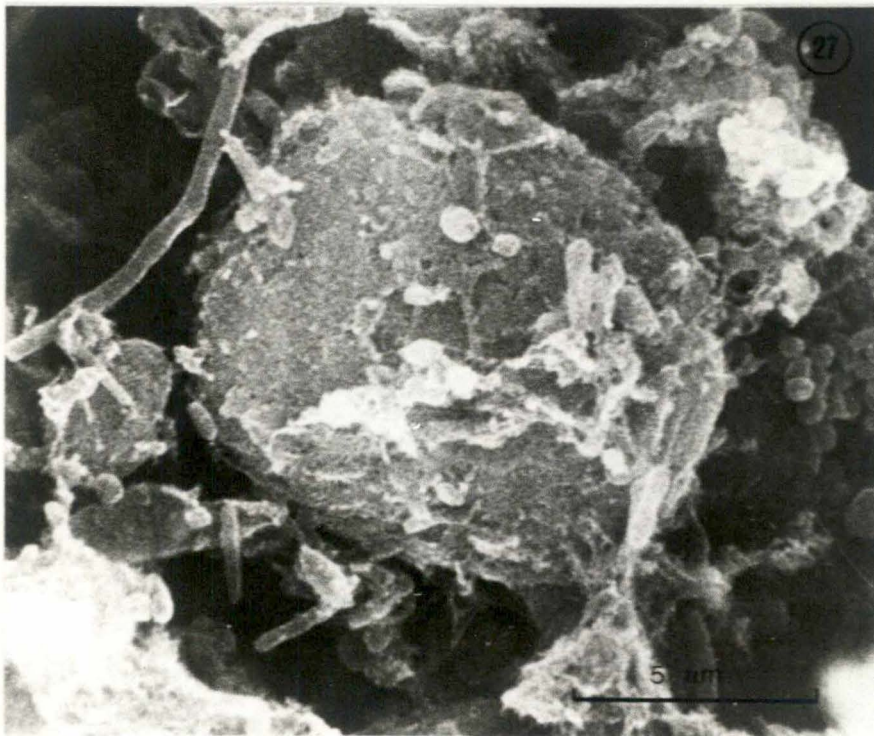
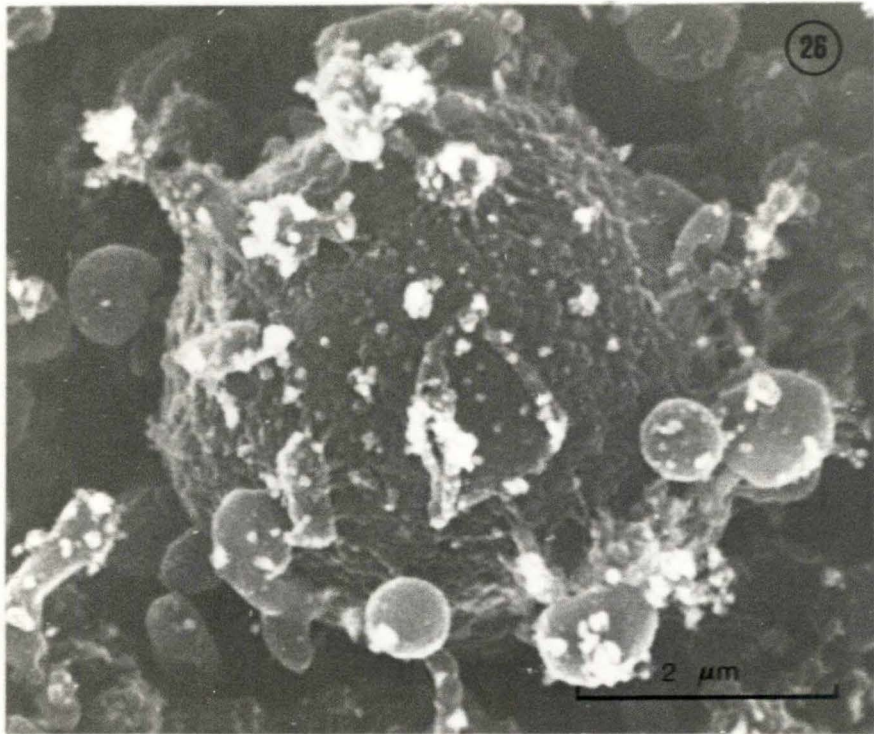
Malgré le grand nombre de lavages effectués lors de la fixation, de nombreuses bactéries adhèrent à la surface de la cellule et semblent retenues par de fins filaments muqueux.

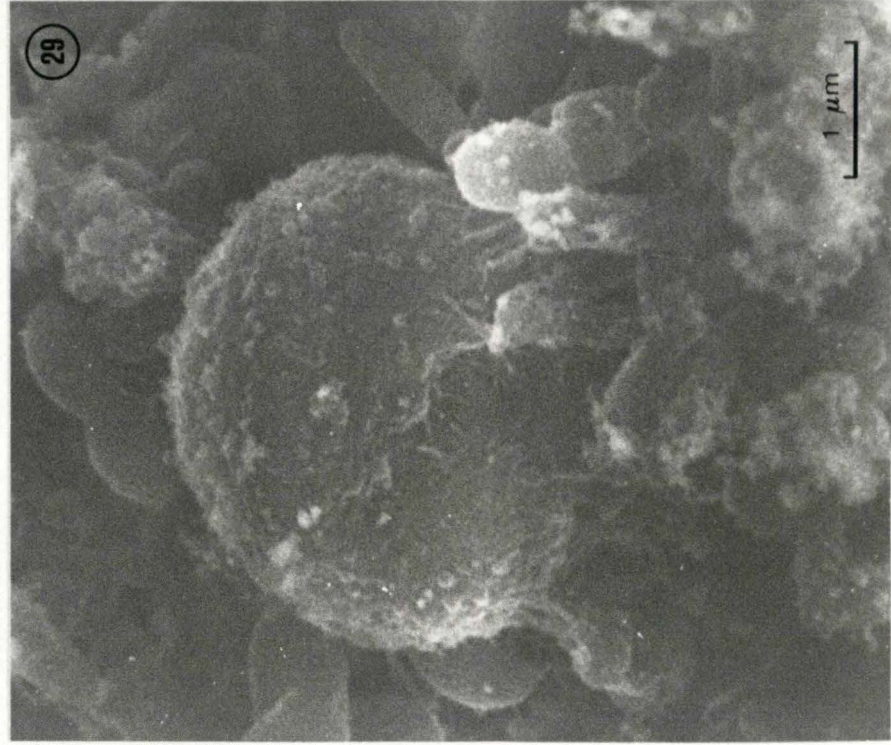
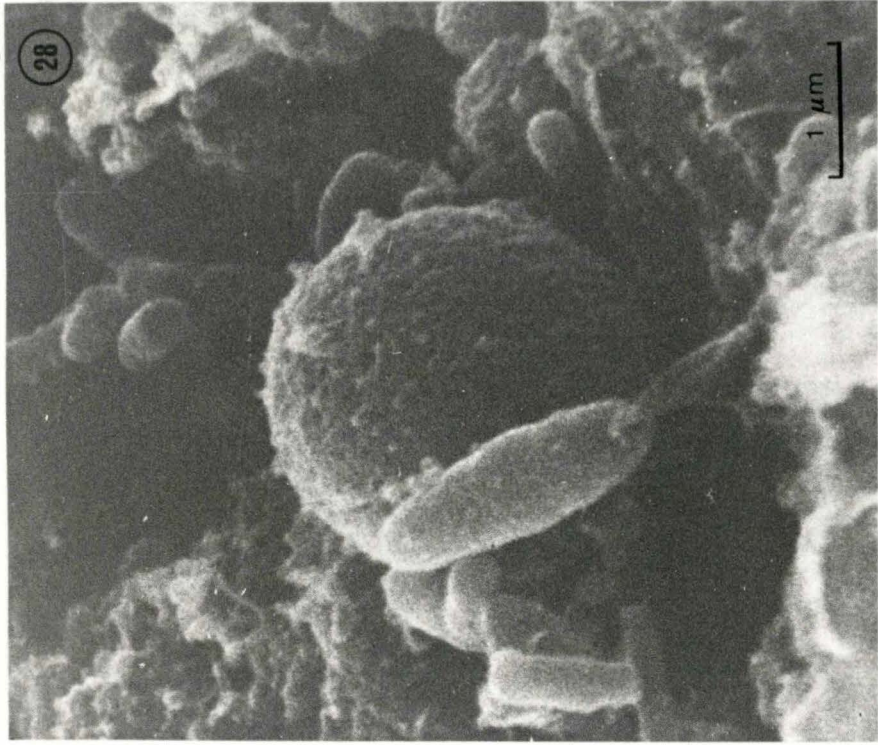
A la figure 32, nous pouvons observer que la surface externe présente un pli.

Figures 26, 27, 28, 29, 30 et 31 :

Formes uniformément sphériques, la couche mucoïde donne à la surface externe un aspect rugueux. Des bactéries adhèrent à la cellule par de fins filaments muqueux.

(26 : x 17.200; 27 : x 6.400; 28 : x 17.200;
29 : x 17.200; 30 : x 6.600; 31 : x 13.200).





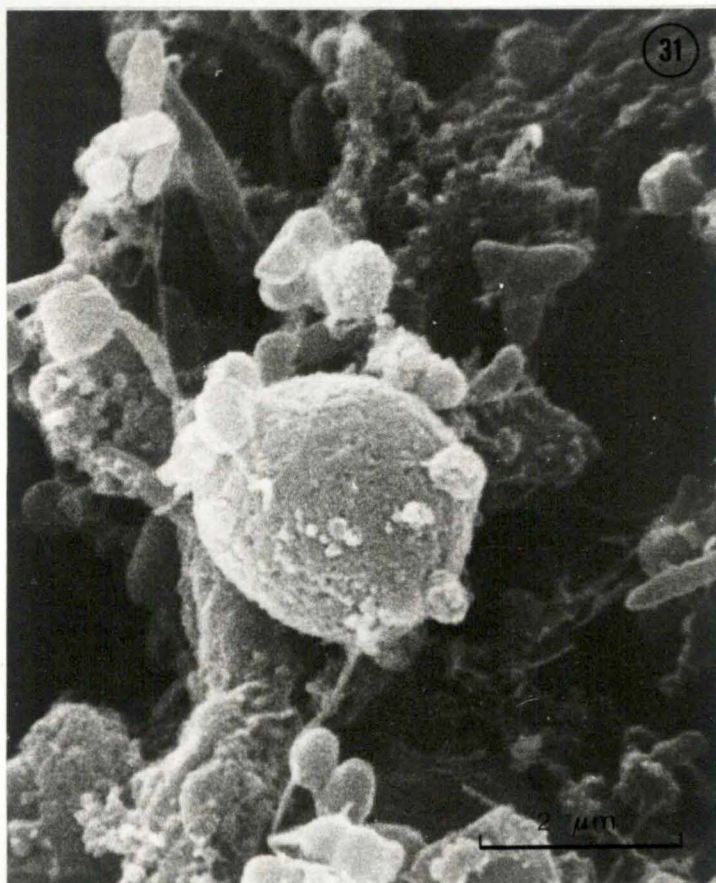
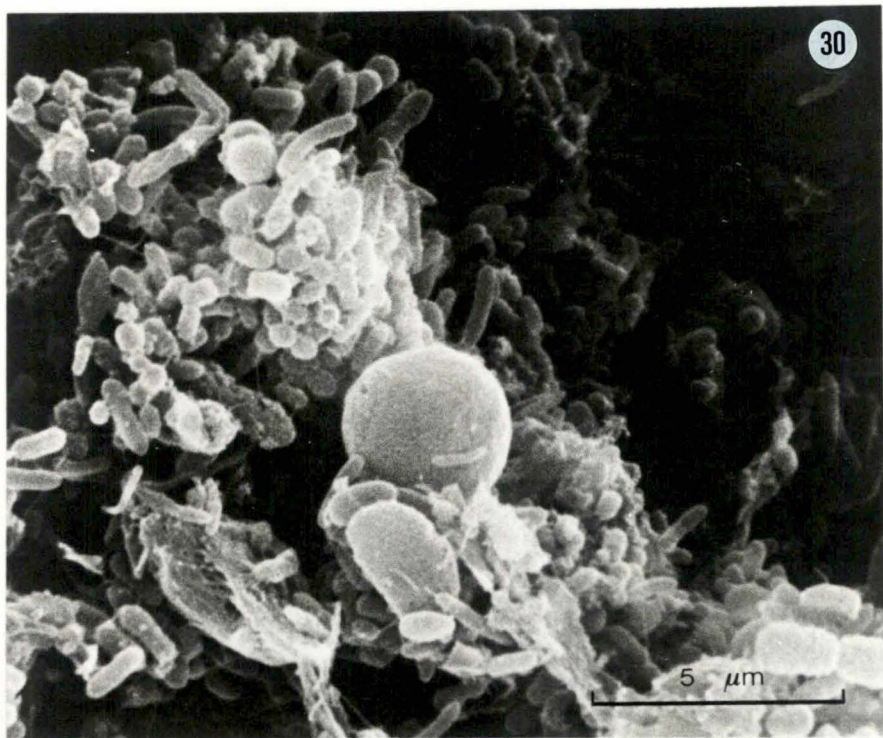


Figure 32 : Forme sphérique, on remarque en haut
à gauche de la cellule, un pli bordé
de plusieurs bactéries.
(x 17.200)

32

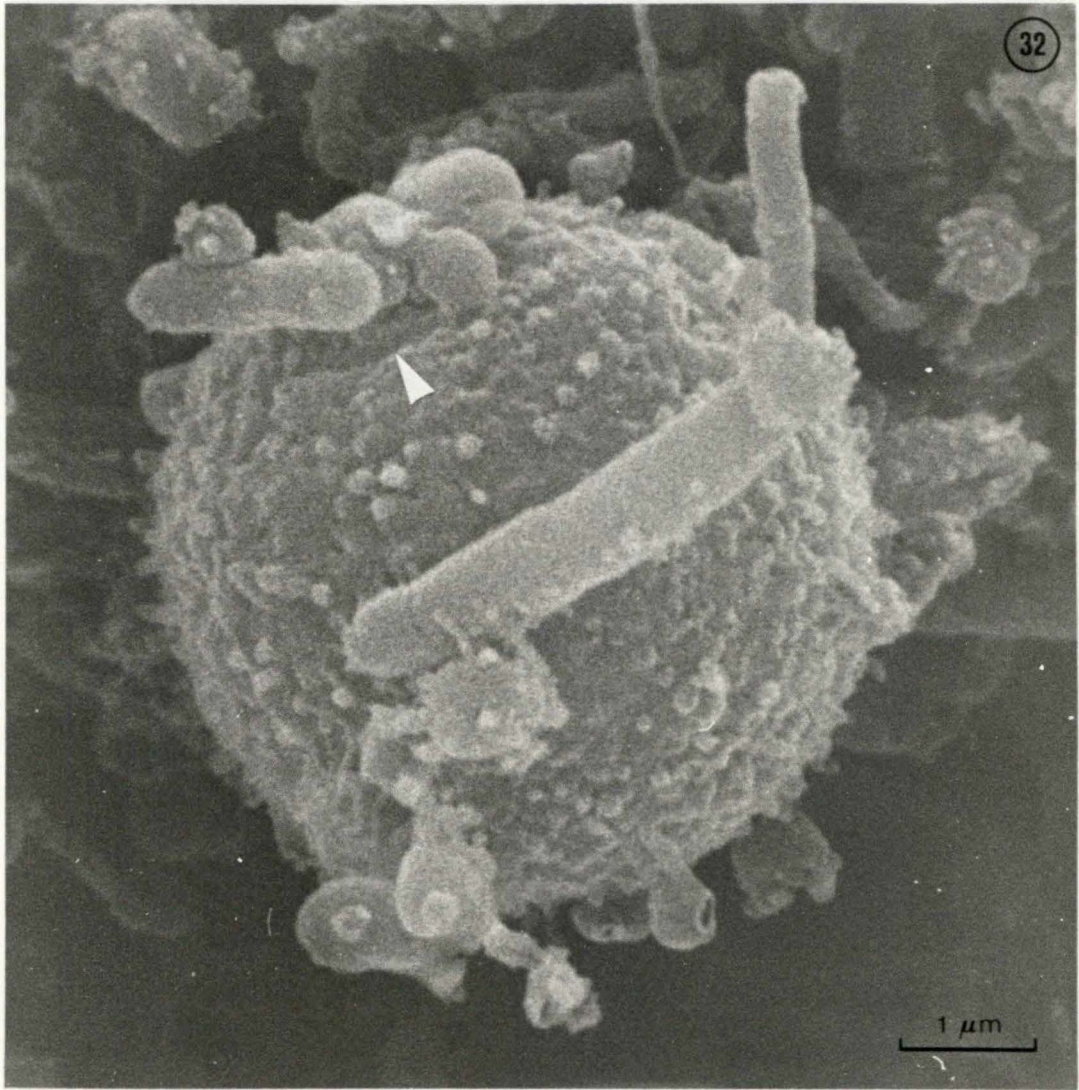
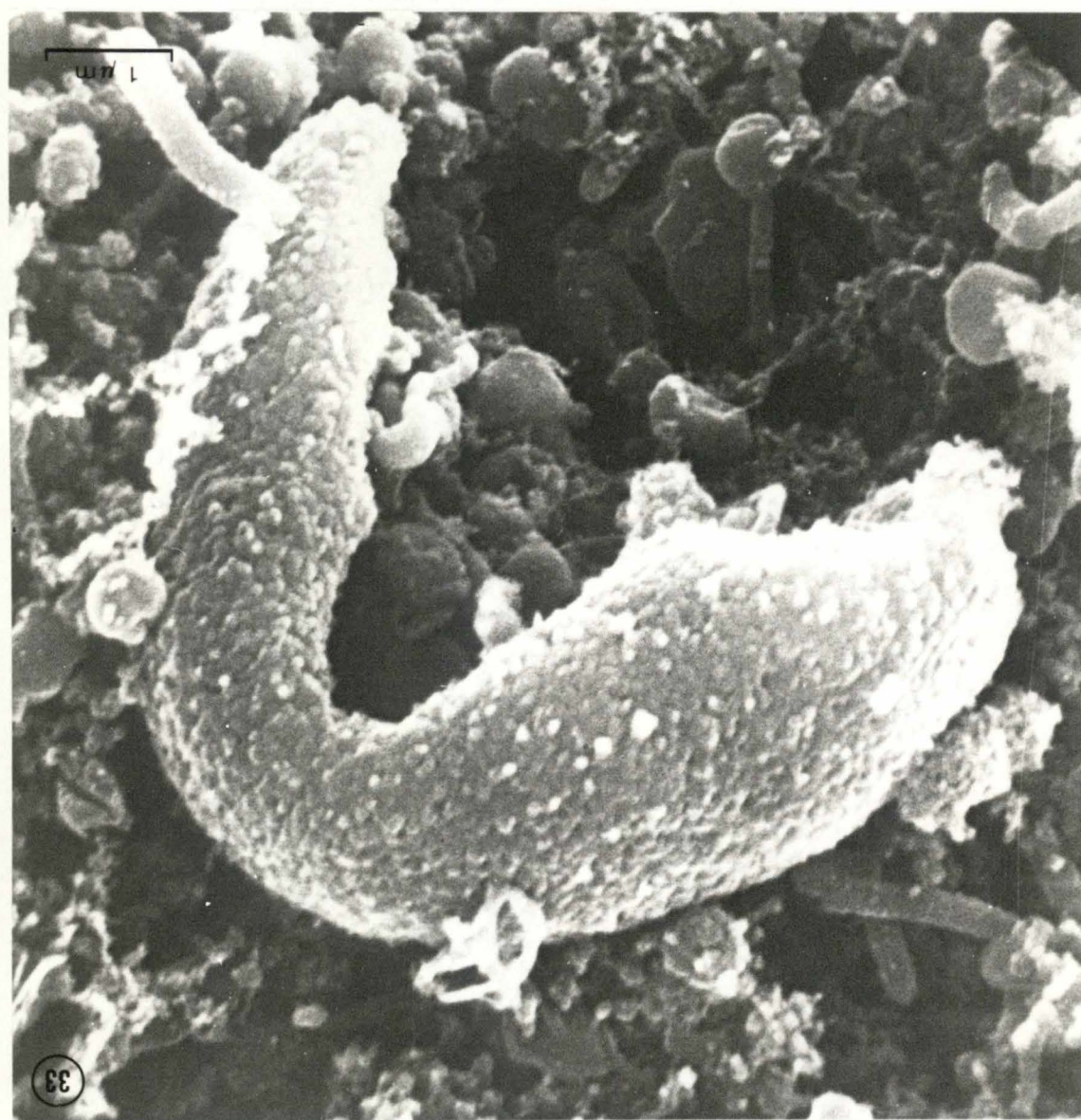
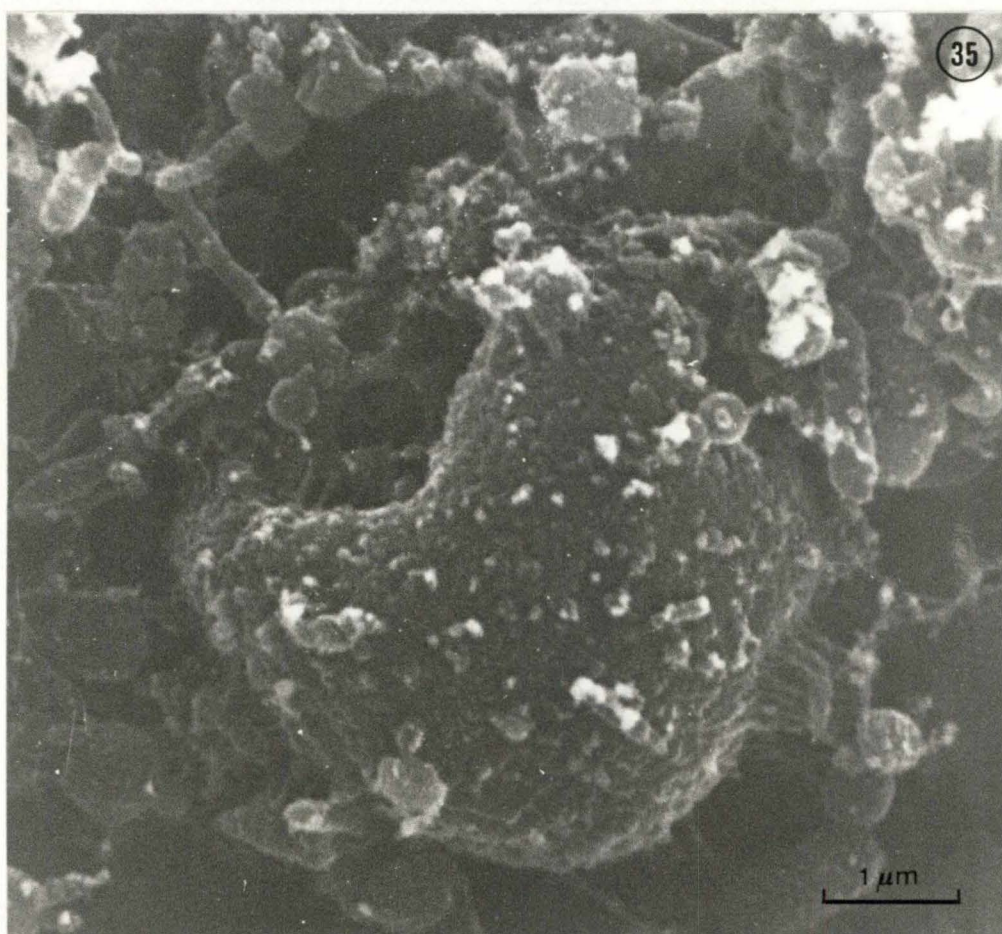
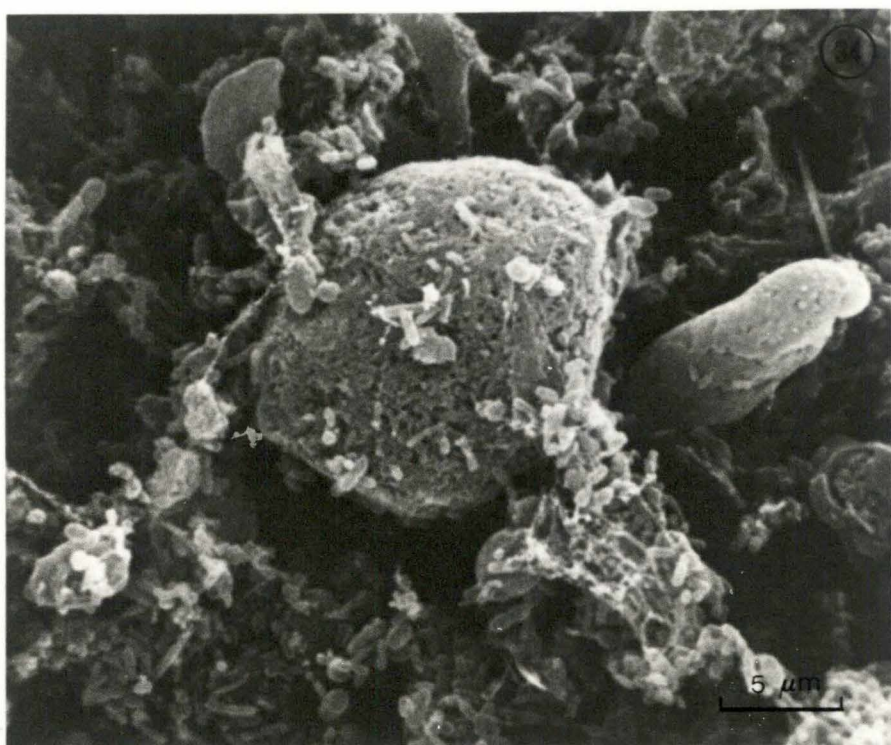


Figure 33 : Cellule en forme de crosse.
(x 17.200)



Figures 34 et 35 : Formes aplaties et lobulées
auxquelles adhèrent des bac-
téries.
(34 : x 3.200; 35 : x 17.200)



D. Microscopie électronique à transmission.

La microscopie électronique à transmission nous a permis d'étudier la cytologie de la cellule. Il faut insister sur le fait que la fixation de Blastocystis hominis pour la transmission donne des résultats très décevants. En effet, cette cellule supporte très mal la centrifugation, or, pour des cellules en suspension la méthode classique consiste à centrifuger la culture entière qui aura été préalablement fixée une première fois dans de la glutaraldéhyde diluée dans du tampon phosphate, mais la plupart du temps les cellules sont lysées (fig. 35').

En apportant un soin tout particulier au temps de fixation et à la vitesse de centrifugation, une légère amélioration a pu être constatée. Cependant, une diminution de la vitesse de centrifugation nous privait de la condensation des cellules en un culot suffisamment résistant pour subir le découpage en cubes de 1 mm^3 .

Nous avons alors utilisé la méthode qui consiste à ajouter à la culture du sérum et quelques gouttes de fibrinogène. On obtient alors un précipité gélatineux qui enserre dans ses liens de fibrine les cellules. Ce précipité sera traité lors de la fixation comme un tissu.

Le respect de l'intégrité des cellules durant la fixation fut le mieux respectée grâce à l'utilisation

du tampon Phosphate Buffer Saline (P.B.S.).

Nous décrirons successivement les différents organites rencontrés chez Blastocystis hominis.

1) La membrane plasmique.

La cellule est limitée par une membrane qui est formée d'un double feuillet : deux feuillets sombres osmiophiles séparés par un espace clair (fig. 36, 38). La membrane n'est pas entourée d'une paroi mais une couche mucoïde la recouvre (fig. 36 et 39). Cette couche n'est pas uniforme et s'interrompt à certains endroits.

On observe parfois, au dessus de la couche mucoïde, une couche plus irrégulière et légèrement plus dense que nous appellerons couche superficielle (fig. 42).

2) La vacuole centrale.

La vacuole centrale occupe dans les formes vacuolaires et granulaires tout l'intérieur de la cellule et repousse vers l'extérieur l'ensemble des organites (fig. 40, 41, 42, 43, 44). Elle est unique par cellule mais présente occasionnellement de petites compartimentations (fig. 43, 50).

La vacuole ne contient pas d'organites. Elle est limitée par une membrane qui est mise en évidence par la précipitation du citrate de plomb utilisé comme

colorant pour les ultra-fines (fig. 37, 41 et 44).

Le contenu de la vacuole est variable, il peut être dense et homogène (fig. 40, 41), ou clairsemé pour la forme vacuolaire (fig. 43).

Pour la forme granulaire, le matériel de la vacuole se présente sous forme de petites sphères au contenu homogène (fig. 44).

3) Le cytoplasme. —

Le cytoplasme entoure la vacuole centrale. Il comprend l'ensemble des organites cellulaires : le ou les noyaux, les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticule endoplasmique, les ribosomes (fig. 41, 42, 43).

4) Le noyau.

En coupes ultra-fines, nous n'observons jamais qu'un seul noyau. Il peut être de forme ronde ou ovale.

L'aspect du noyau est généralement constant. Il présente une précipitation de chromatine et est entouré d'un espace péri-nucléaire (fig. 45, 46, 47, 48).

5) L'appareil de Golgi.

Il se situe, en général, près du noyau. Il est composé de citernes aplaties et disposées parallèlement les unes aux autres (fig. 48, 49).

6) Les mitochondries.

Elles se retrouvent en grand nombre dans la cellule, réparties dans toute la bande cytoplasmique.

Elles présentent généralement une forme ronde ou ovale. La matrice des mitochondries est dense aux électrons. Les crêtes des mitochondries sont le plus souvent tubulaires (fig. 50, 51, 52, 53).

7) La vacuole lipidique.

Rares dans les jeunes cellules, elles se retrouvent en nombre croissant dans les cellules vieillissantes.

Elles se présentent sous la forme de vacuoles sphériques au contenu homogène (fig. 54).

8) Le réticulum endoplasmique.

Il se présente sous formes de tubules ou de saccules. Sur la surface externe du réticulum endoplasmique rugueux on distingue nettement les ribosomes (fig. 53, 55).

9) Inclusions cytoplasmiques.

Dans le cytoplasme, nous retrouvons un grand nombre de ribosomes.

Figure 35' : Lors de la centrifugation, Blastocystis
hominis se lyse très facilement.
(x 13.000)

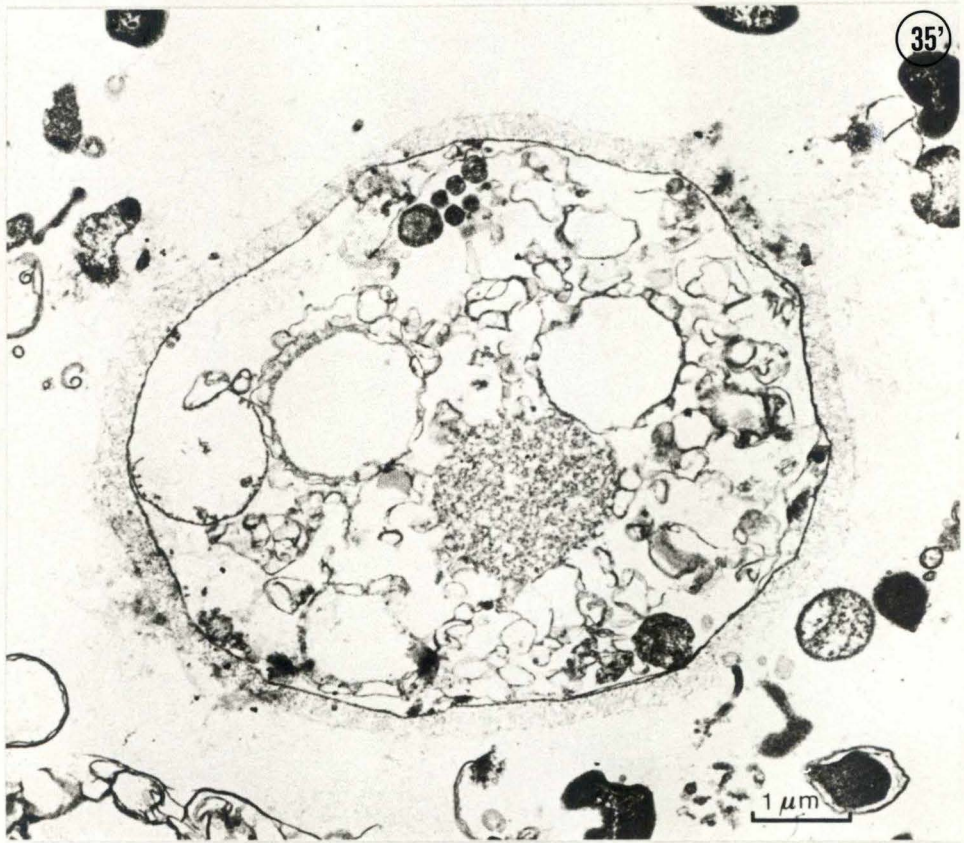
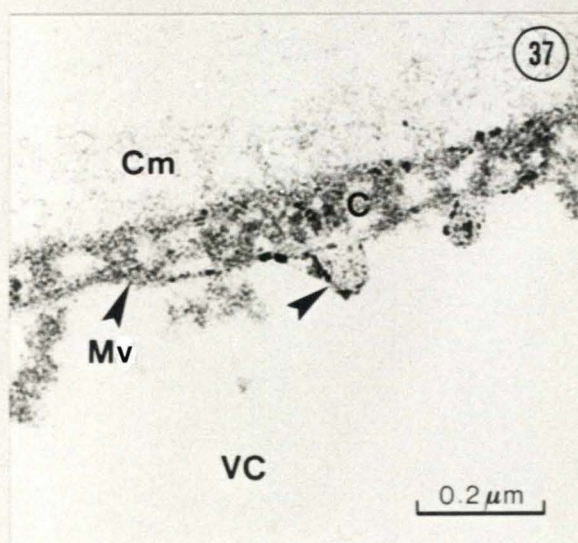
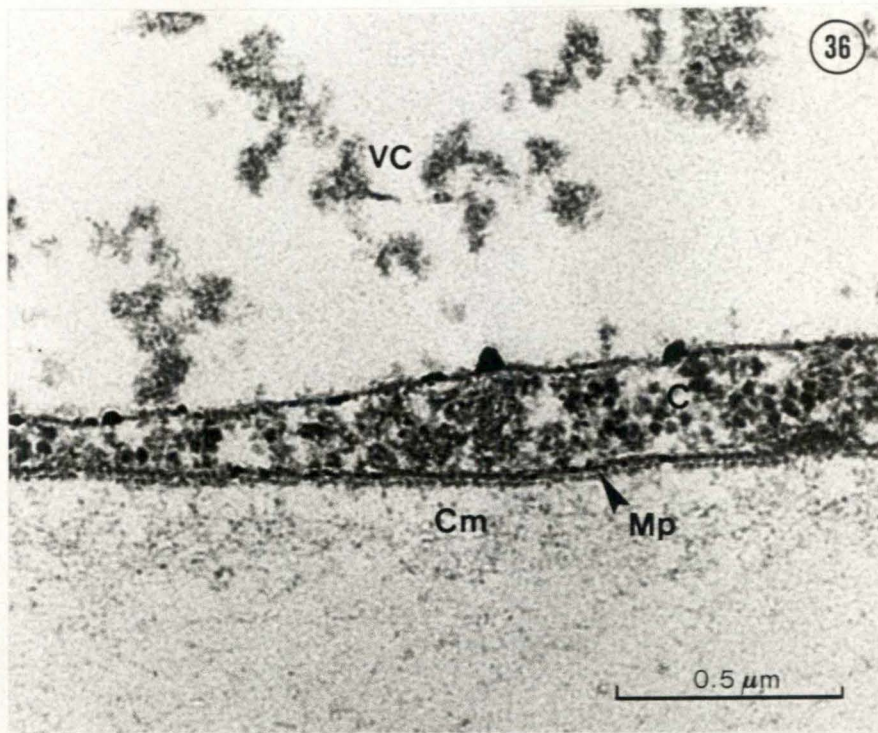


Figure 36 : La membrane plasmique (Mp) apparaît constituée par deux feuillets denses, séparés par un espace clair. Une couche mucoïde (Cm) recouvre la face externe de la membrane plasmique; on distingue la vacuole centrale (VC) et le cytoplasme (C).
(x 60.000)

Figure 37 : La vacuole centrale (VC) est cernée par une membrane (Mv) qui forme parfois de petites invaginations faisant saillie dans la vacuole centrale (VC).
(x 85.000)



Figures 38 et 39 : La membrane plasmique (Mp) limite le cytoplasme (C) et est recouverte de la couche mucoïde (Cm). En 39 on distingue une mitochondrie (M) dans le cytoplasme et en dessous de la bande cytoplasmique se situe la vacuole centrale.

(38 : x 85.000; 39 : x 37.500)

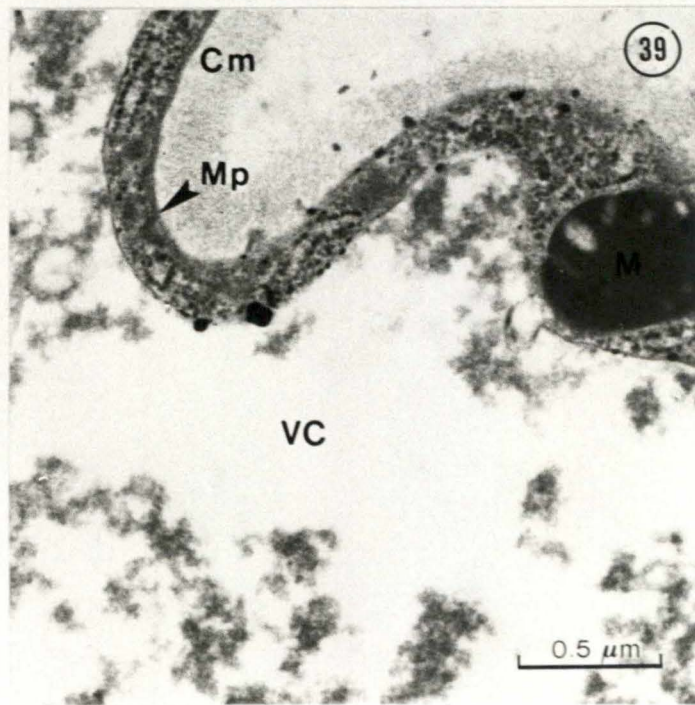
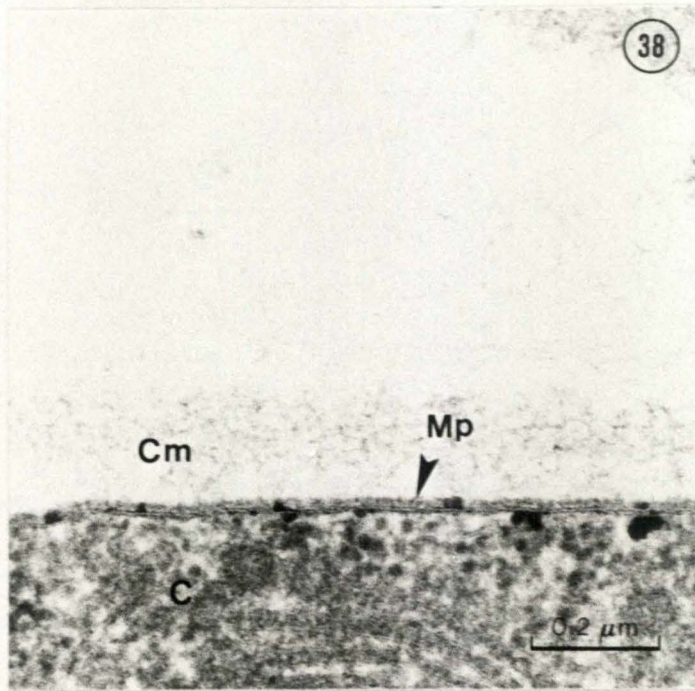
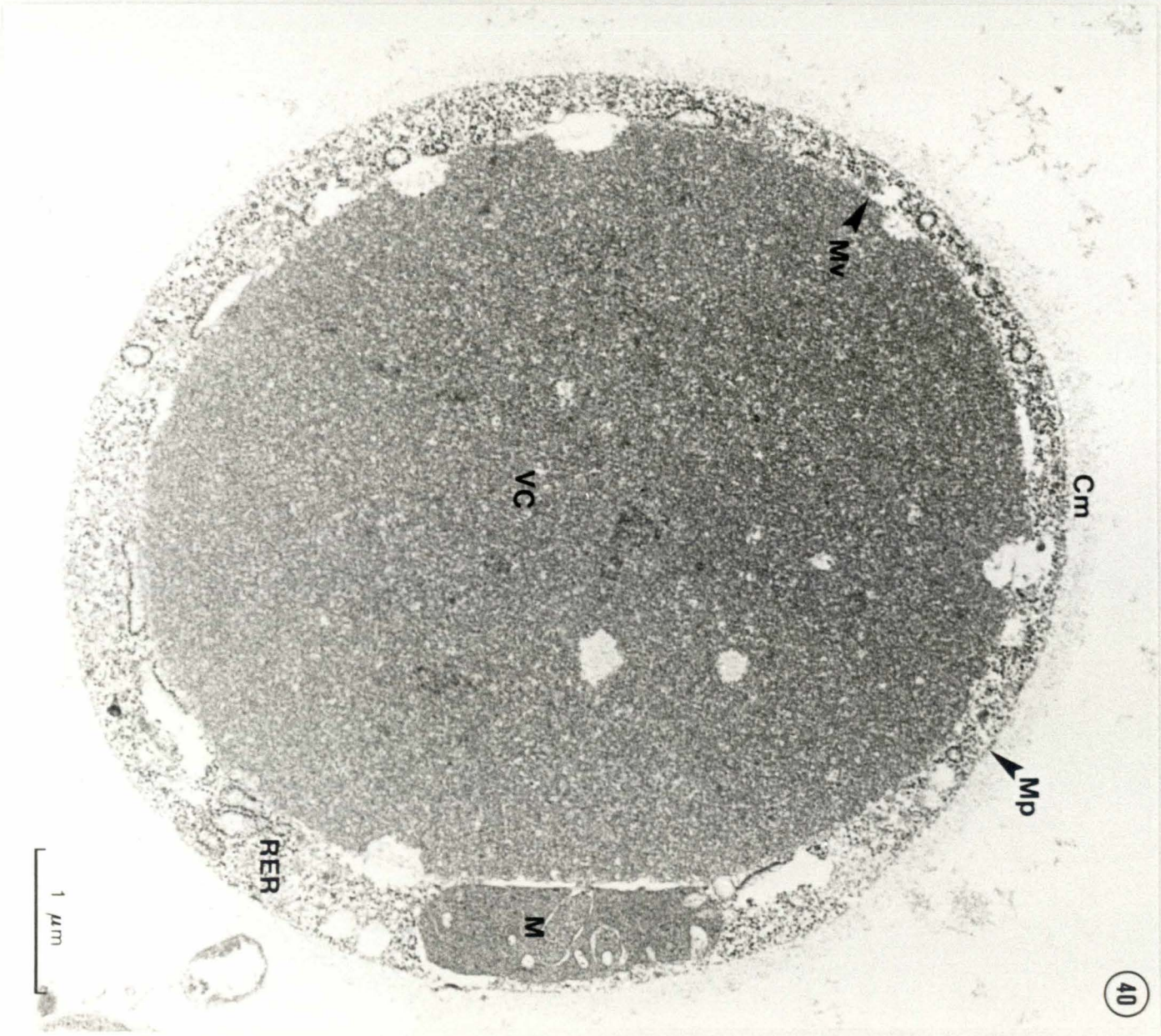


Figure 40 : Blastocystis hominis, forme vacuolaire.
La vacuole centrale (VC) occupe le centre de la cellule et repousse le cytoplasme et tous ses éléments vers l'extérieur. Dans le cytoplasme, on distingue une mitochondrie (M), du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La vacuole centrale (VC) est limitée par la membrane vacuolaire (Mv).
La membrane plasmique (Mp) recouverte de la couche mucoïde isole le cytoplasme du milieu extérieur.
(x 22.750)



Figures 41 et 42 :

Formes vacuolaires de Blastocystis hominis.

On distingue la vacuole centrale (VC), la membrane vacuolaire (Mv), la membrane plasmique (Mp) surmontée de la couche mucoïde.

Dans le cytoplasme, on distingue des mitochondries (M), le noyau (N) et son espace péri-nucléaire (EP).
(41 : x 17.750; 42 : 17.750)

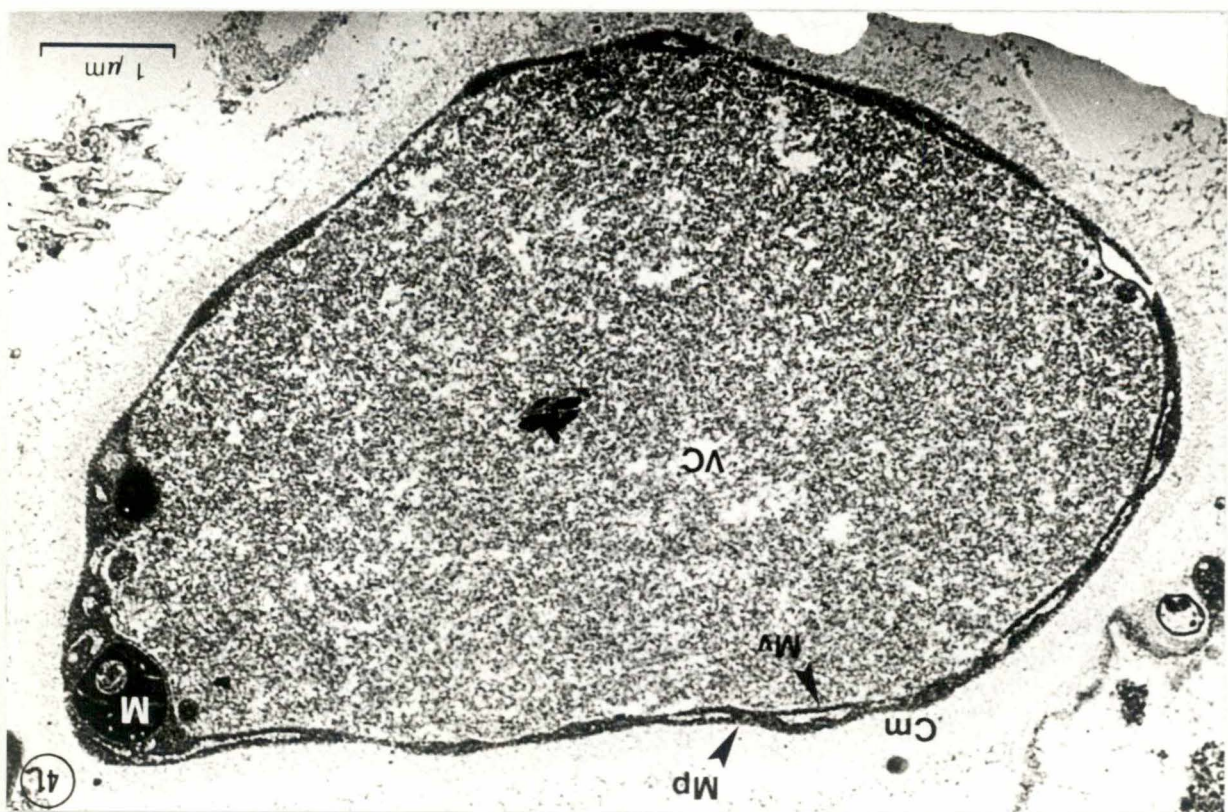
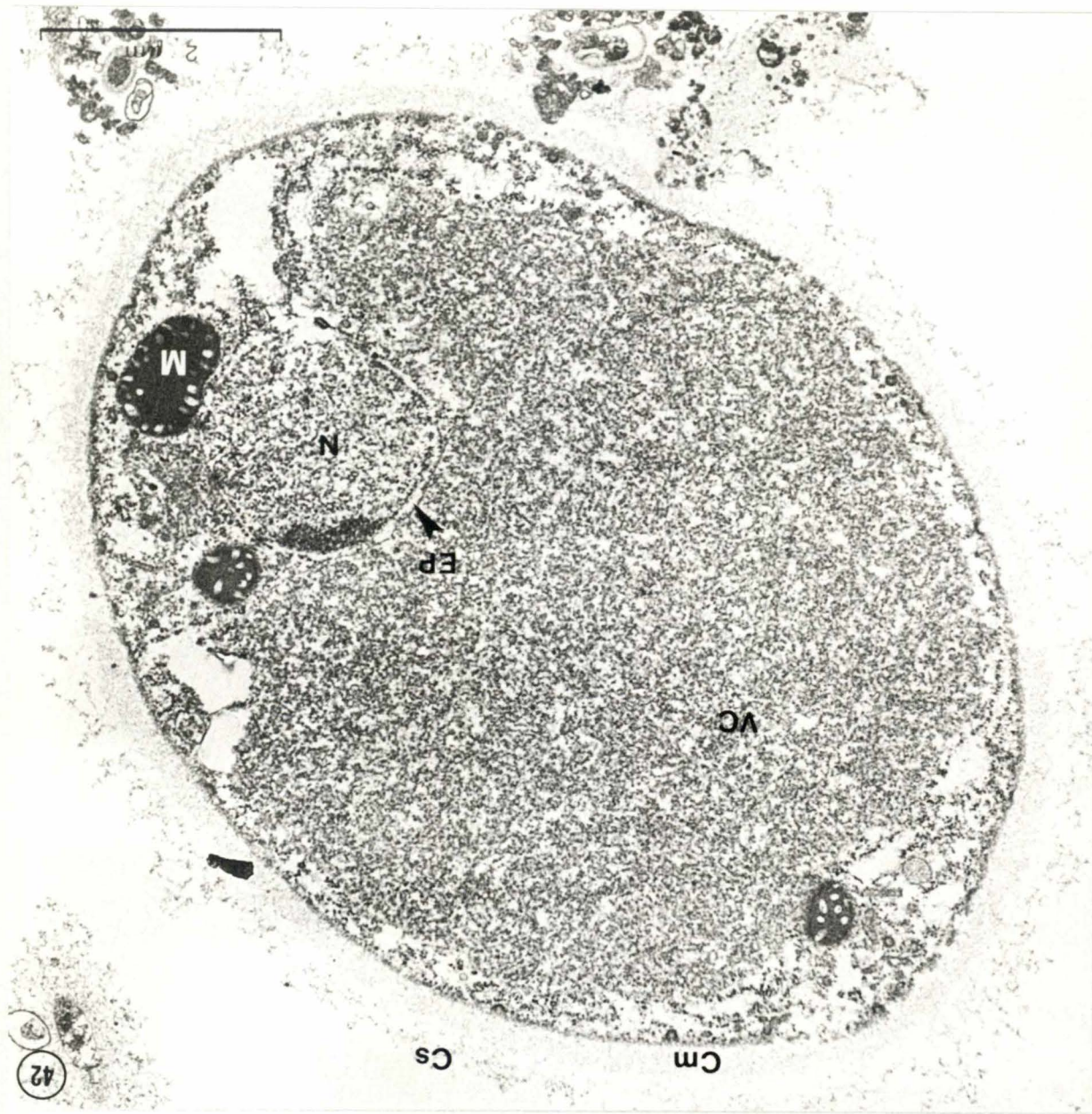


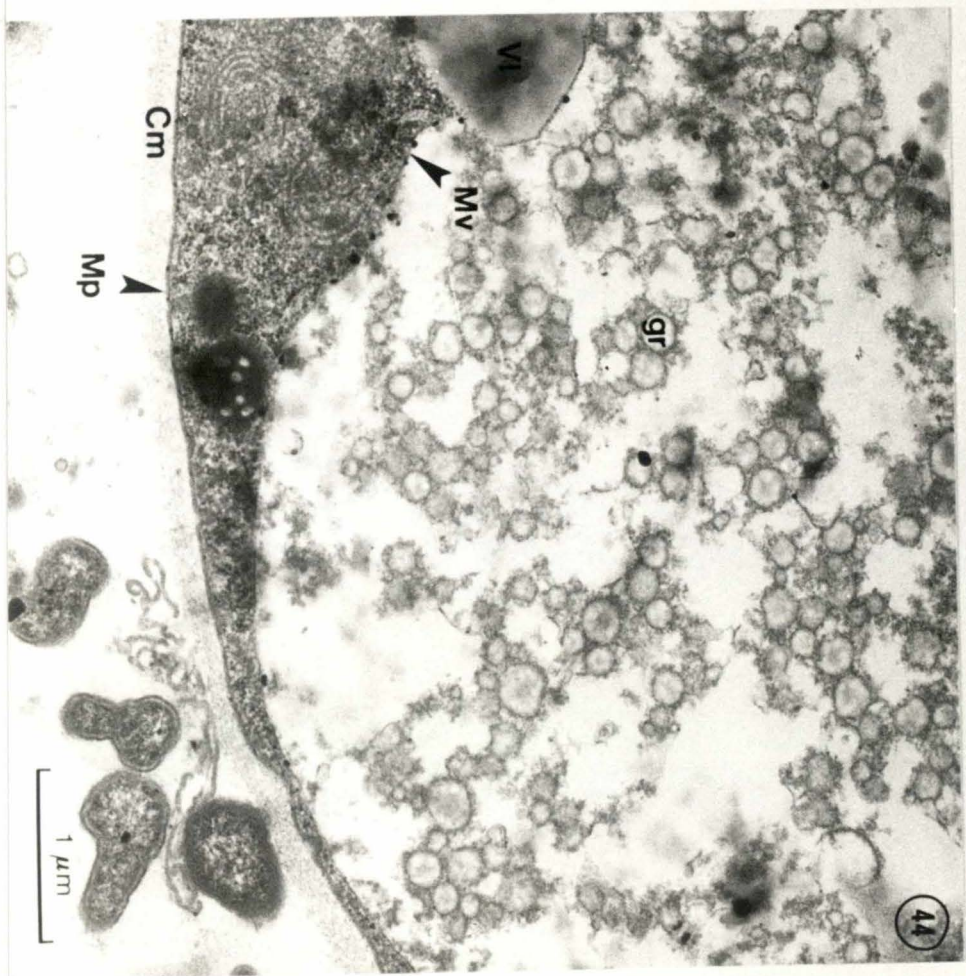
Figure 43 : Cette micrographie nous montre une forme vacuolaire de taille courante et une forme vacuolaire géante.

Le contenu de la vacuole centrale (VC) est peu dense et est réparti de façon très irrégulière. La flèche indique des vacuoles secondaires (VS).

(x 4.750)

Figure 44 : Cette micrographie intéresse un détail de la vacuole centrale d'une forme granulaire de Blastocystis hominis.

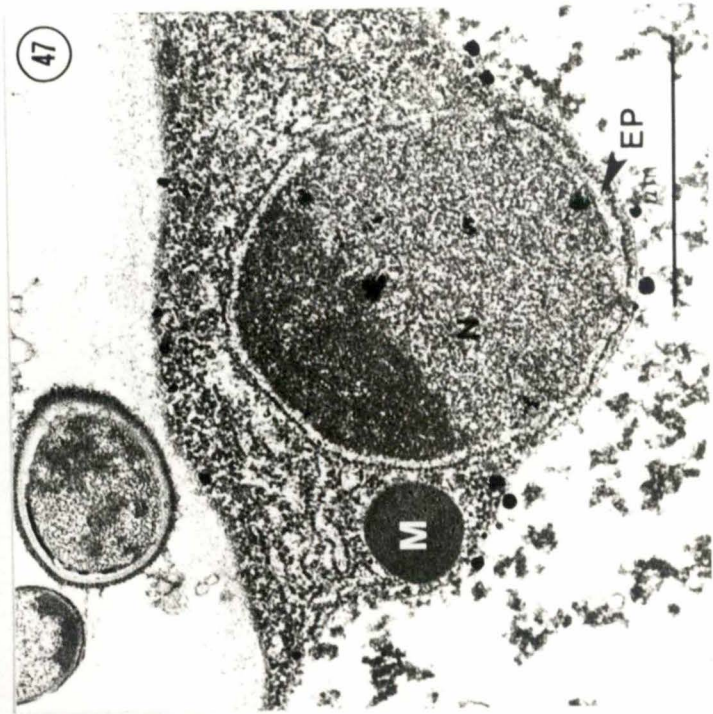
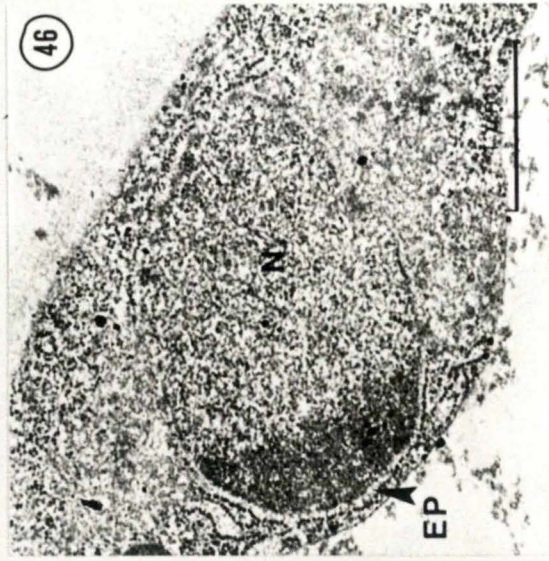
Cette vacuole renferme de nombreux petits granules (gr) au contenu homogène. La vacuole centrale est limitée par la membrane vacuolaire (Mv). Sur la gauche on distingue une vacuole lipidique (Vl) au contenu homogène. (x 22.700)



Figures 45, 46 et 47 :

Le noyau (N) est généralement de forme ronde ou ovale, il présente une précipitation de chromatine. La membrane nucléaire comporte un espace péri-nucléaire (EP) bien visible.

(45 : x 22.750; 46 : x 22.750; 47 : x 27.500)

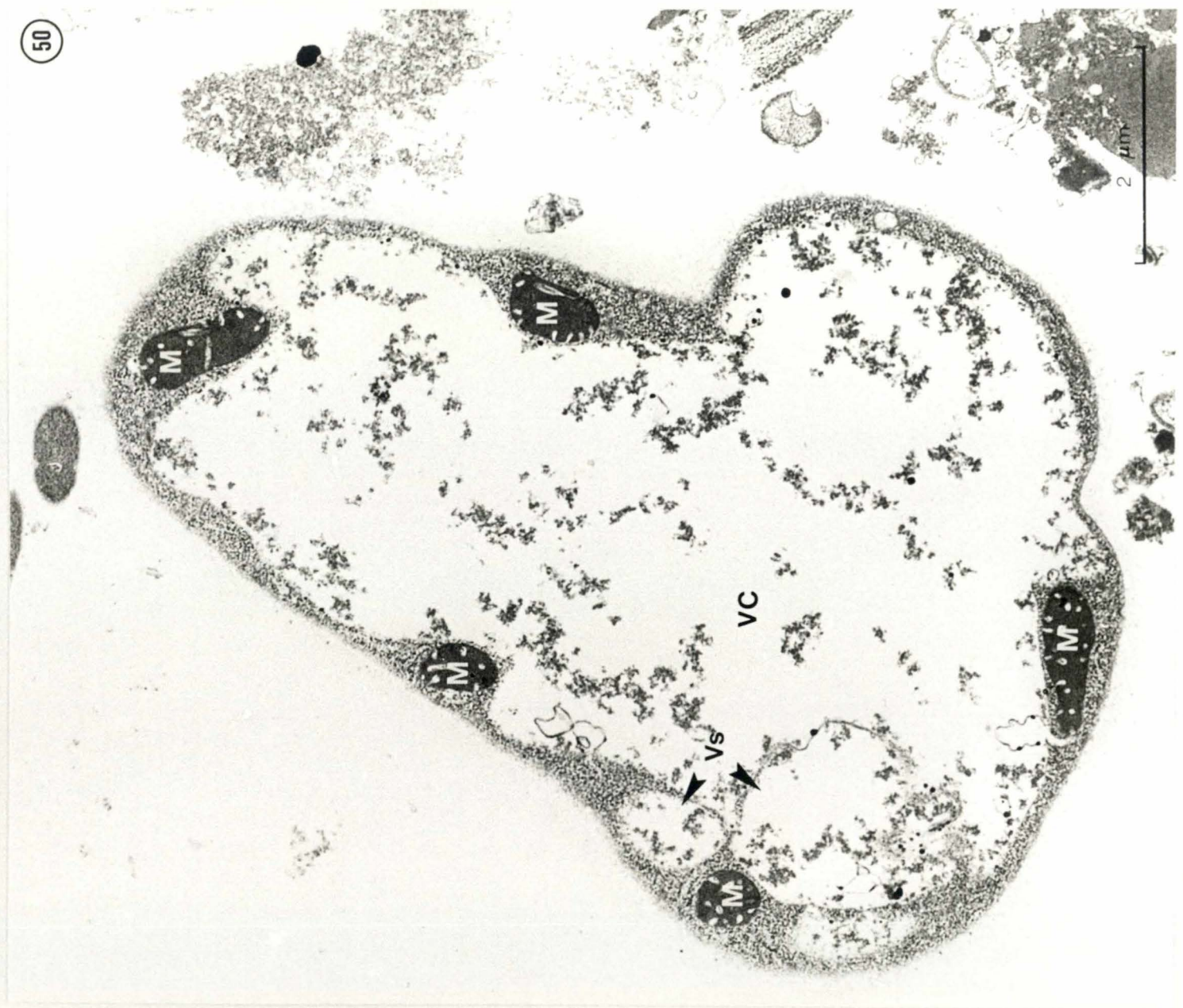


Figures 48 et 49 : Sur ces micrographies de formes vacuolaires, on peut distinguer l'appareil de Golgi (G) qui se situe la plupart du temps près du noyau (N); e, 49 on remarque la présence d'une vacuole lipidique (V1) et de la membrane plasmique (MP).

(48 : x 37.500; 49 : x 72.500)



Figure 50 : Cette microphotographie d'une forme vacuolaire montre la répartition des mitochondries (M) dans le cytoplasme. La vacuole centrale (VC) présente des petites vacuoles secondaires (Vs).
(x 17.750)



Figures 51, 52 et 53 :

Détails du cytoplasme de forme vacuolaire.

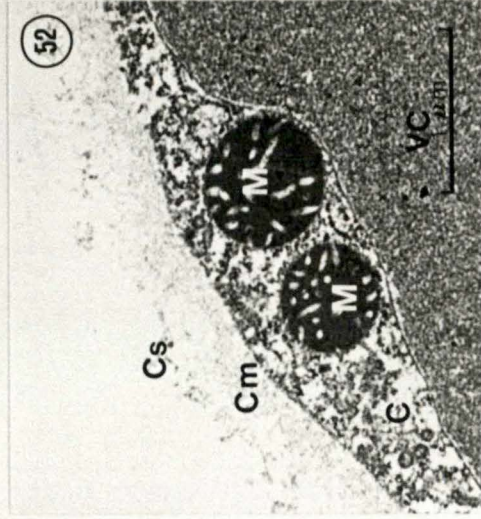
Les mitochondries (M) renfermant des crêtes généralement tubulaires, avec une matrice mitochondriale très dense et opaque aux électrons. La forme des mitochondries est souvent ronde ou ovale.

(51 : x 47.500; 52 : x 22.750; 53 : x 27.500)

51



52



53



Figure 54 : Détails d'une vacuole lipidique (V1) au contenu homogène localisée dans la vacuole centrale (VC).
(x 47.500)

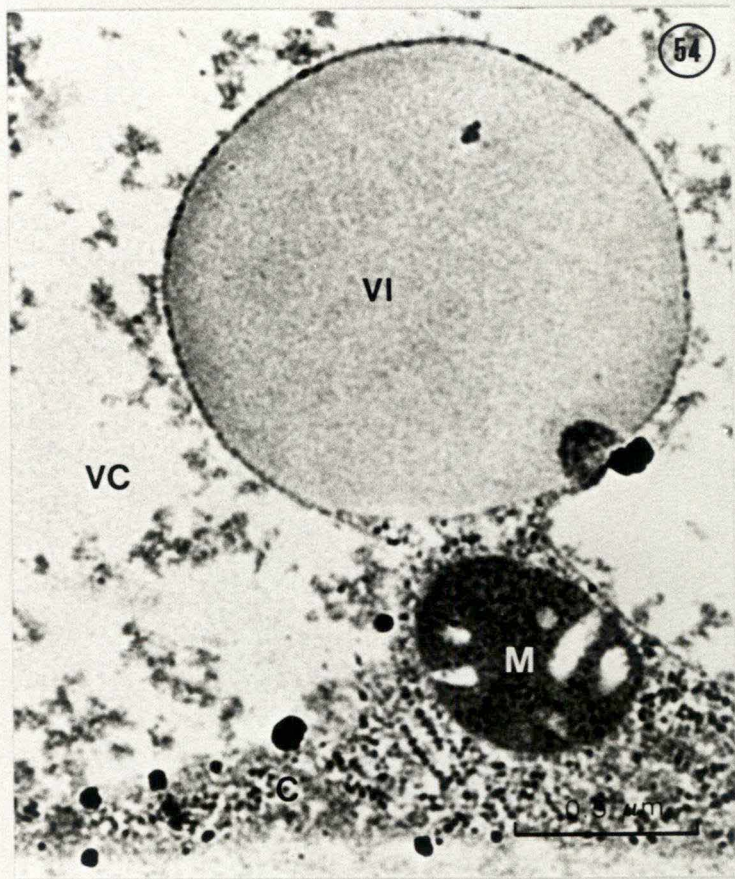
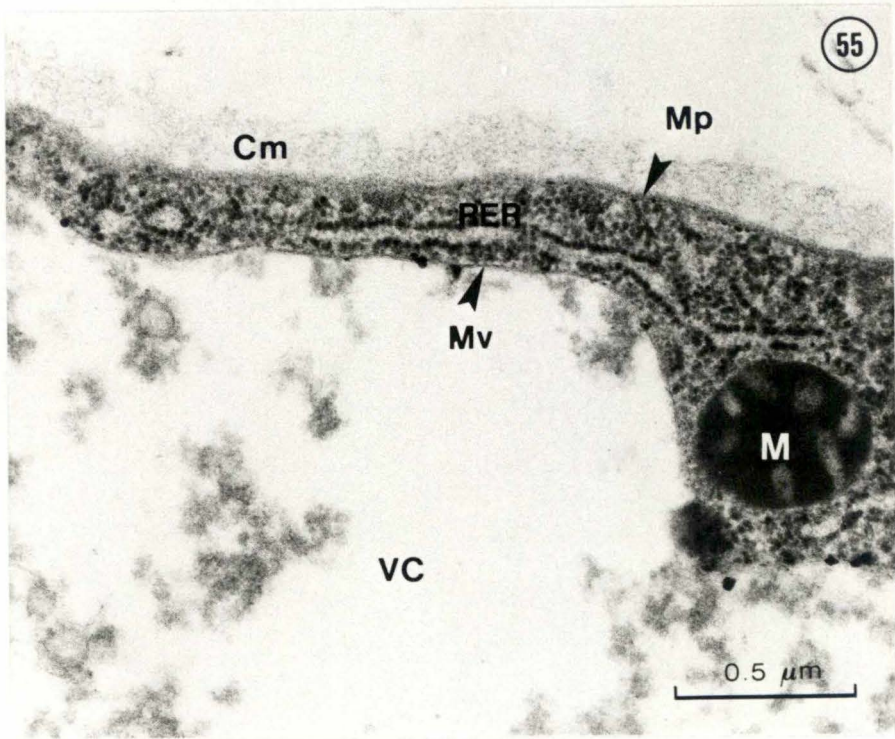


Figure 55 : Détails d'une forme vacuolaire.

Le réticulum endoplasmique rugueux (RER), se présente sous la forme d'un réseau de membranes recouvertes du côté externe par un grand nombre de ribosomes.

(x 47.500)



CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSION.

de manière caractéristique

Nous avons remarqué qu'en culture Blastocystis hominis évoluait sensiblement de la même manière. Dans les selles et en début de culture, ce sera la forme vacuolaire qui sera prédominante et elle sera accompagnée de quelques rares formes amiboïdes. A ce stade on remarque également que des formes vacuolaires entrent en division.

Deux à trois jours après, des formes granulaires apparaissent.

Par lyse, la forme granulaire libère de petites cellules qui ressemblent aux formes vacuolaires.

Vers la fin de culture, la proportion de formes amiboïdes augmente et ce type sera le seul présent dans le milieu.

D'après ces éléments, nous diviserons la croissance des cellules en trois phases :

- une première phase sera dite de "croissance" pendant laquelle le nombre de cellules augmente très rapidement,
- dans une seconde phase, le nombre de cellules se stabilise, nous nous trouvons dans la phase "d'état",
- dans la troisième phase, les cellules acquièrent toutes une forme amiboïde en se déformant, puis le nombre de cellules décroît et nous arrivons au stade de "déclin".

*à étudier
un objet de
comparaison*

La forme amiboïde ne se retrouvant qu'en très faible proportion lors de la phase de croissance et de la phase d'état mais en grande proportion lors de la phase de déclin, elle nous apparaît non pas comme un type de forme, mais plutôt comme une cellule présentant les premiers signes d'agonie.

Nous avons remarqué que quelques formes vacuolaires présentaient, au sein de la vacuole centrale, de fines granulations.

A la fin du développement de ces granules, il n'était plus possible de distinguer cette forme de la forme granulaire. Nous verrons là le stade de formation de la forme vacuaire vers la forme granulaire.

Nous schématisons le cycle cellulaire comme ceci :

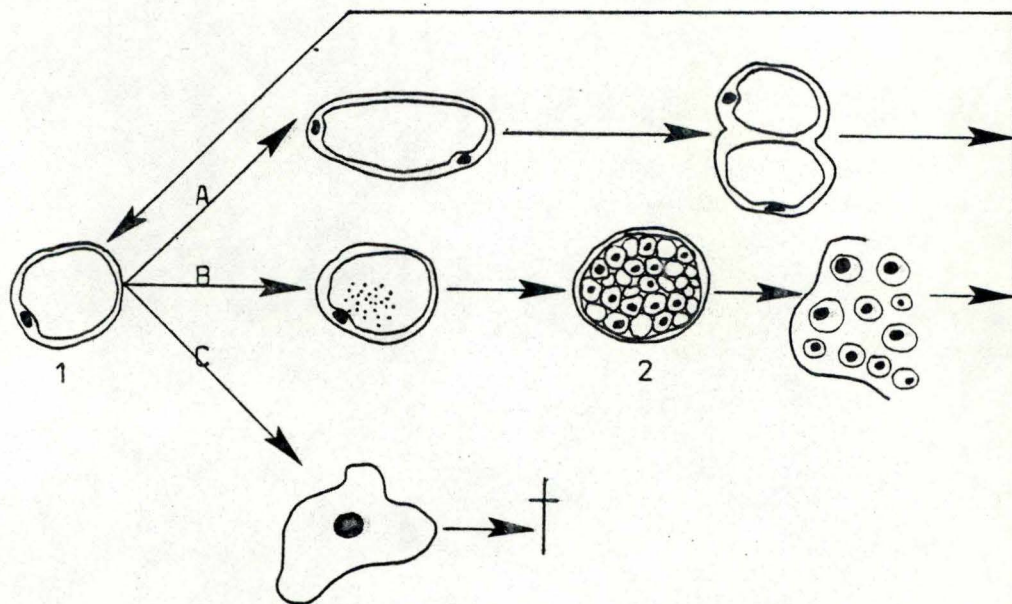


Figure 56: A. Fission binaire, B. Endosporulation, C. Mort cellulaire; 1. Forme vacuaire, 2. Forme granulaire.

Blastocystis hominis présente ainsi deux modes de reproduction, la fission binaire et la reproduction endogène.

Le milieu comprend du sérum coagulé de cheval, des extraits de muqueuse intestinale de porc dilués dans du R.P.M.I. 1640 + 25 mM HEPES permet de conserver les cellules en culture deux mois sans axénisation.

Il est à signaler qu'aucune méthode d'enrichissement n'a donné de résultat utile, ces méthodes comprenant toutes une ou plusieurs étapes de centrifugation ce qui conduit à la lyse des cellules. Ces méthodes seront donc exclues pour isoler Blastocystis hominis des autres constituants des matières fécales. La filtration de la selle, après dilution dans le milieu de culture, sur couches de gaze, purifie suffisamment le milieu pour faciliter l'observation en microscopie mais ne nous permet pas d'obtenir une préparation pure de Blastocystes.

Une culture pure de Blastocystes nous permettrait d'effectuer une galerie biochimique, de mettre en évidence une éventuelle toxine et d'isoler le D.N.A. afin d'en étudier la séquence, ce serait la méthode la plus fine pour déterminer l'appartenance phyllogénétique.

La microscopie électronique à balayage ne nous a pas montré de différences entre les différentes formes.

La microscopie électronique à transmission ne nous a pas permis de voir une distinction tranchée entre les organites de la forme vacuolaire et ceux de la forme granulaire. Il n'y a que le contenu de la vacuole centrale qui nous permet de voir la différence entre ces deux formes.

Nous n'avons pas réussi à fixer la forme amiboïde. Ceci confirmerait le fait que cette cellule est arrivée à un stade ultime et que le traitement de la fixation est très délicat. Nous n'avons jamais observé de processus d'endocytose de bactéries par les Blastocystes.

+
+ +

En conclusion de ces travaux, nous pouvons dire que Blastocystis hominis :

- se présente sous une forme de vie : la forme vacuolaire.
- se reproduit selon deux modes :
 - la fission binaire de la forme vacuolaire
 - l'endosporulation de la forme vacuolaire qui portera alors le nom de forme granulaire.
- ne présente pas de caractéristiques générales de champignons :
 - filamentation

- paroi de nature glucidique et de structure cellulosopeptidique.

Par contre, il existe également une grande vacuole centrale chez les champignons.

Si la majorité des caractéristiques des champignons s'opposent à celles de Blastocystis hominis, le mode de culture, les deux modes de division et les caractéristiques cytologiques ne s'opposent pas à celles des protozoaires.

Il nous semble inutile de vouloir tirer des conclusions trop hâtives quant à l'appartenance phyllogénétique dont la détermination nécessiterait encore l'apport de données biochimiques, cytologiques et génétiques.

BIBLIOGRAPHIE.

- Arago, H. : 1922
Etudes sur les Blastocystis.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz XV, fasc. I, p. 143-151.
- Berkaloff, A., Bourguet, J., Favard, P., Lacroix, J.-C.
1977
Biologie et physiologie cellulaire I, II, III, IV
Hermann.
- Boeck, W.-C. and Drbohlav, J., 1925
The cultivation of *Endamoeba histolytica*.
Am. J. Hyg., 5, p. 271-407.
- Bourée, P, 1983
Aide mémoire de Parasitologie.
Flammarion.
- Brumpt, E., 1912
Blastocystis hominis n. sp. et formes voisines.
Bull. Soc. Path. Exot. 5, p. 725-730.
- Calderin, C., 1937
El *Blastocystis hominis* como parasito patogeno del hombre.
Rev. Med. Trop. Parasit. Bact. Clin. Lab. 3, p. 207-213.
- Euzeby, J., 1969
Cours de mycologie médicale comparée.
Vigot Frères, éditeurs.

- Guillaumin, D., 1980
La pratique du microscope électronique à balayage.
Masson.

- Hagege R. et J., 1980
La pratique du microscope électronique conventionnel.
Masson.

- Jadin, J.-M., 1978
Trypanosomes et leishmanies africains.
J.J. Symoens, éditeur.

- Leger, N., Notteghem, M.-J., Pesson, B., 1981
Guide de parasitologie pratique.
S.E.D.E.S.

- Lontie, M., Vandepitte, J., 1977
Atlas de microbiologie médicale.
Librairie Maloine, S.A.

- Lynch, K.M., 1922
Blastocystis species in culture.
Am. J. Med. 2, p. 539-549.

- Lynch, K.M., 1922
Cultivation of Blastocystis hominis and determination
of species.
Am. J. Med. 2, p. 539-549.

- Maillet, M., 1977
Abrégé de cytologie.
Masson.

- Manet, L. et Savel, J., 1971
Techniques usuelles de biologie clinique.
Parasitologie.
Flammarion.

- Olds, R.-J., 1979
Atlas en couleurs de microbiologie.
Maloine S.A., éditeur.

- Panayotatou, A., 1928
Sur la blastocystose. Trois cas d'entérite à Blasto-
cystis hominis.
Bull. Soc. Path. Exot. 21, p. 755-760.

- Phillips, P.B. and Zierdt, C.H., 1976
Blastocystis hominis : Pathogenic potential in human
patients and in gnotobiotés.
Exper. Parasitol. 39, p. 358-364.

- Pilet, C., Bourdon, J.L., Toma, B. et Balastre, C.,
1981
Bactériologie médicale et vétérinaire.
Doin.

- Preer, J.P., Preer, L.B. and Jurand, A., 1974
Kappa and other endosymbionts in Paramecium aurelia.
Bacteriological Reviews 38, p. 113-163.

- Roland, J.C., Szöllösi, A. et D., 1979
Atlas de biologie cellulaire.
Masson.

- Tan H.K. and Zierdt, C.H., 1973
Ultrastructure of Blastocystis hominis.
Z. Paratenk. 42, p. 315-324.

- Tan, H.K., Harrison, M. and Zierdt, C.H., 1974
Freeze etch studies of the granular and vacuolated forms of Blastocystis hominis.
Z. Parazitenk. 44, p. 267-278.

- Van Saanen-Ciura, M. and El Achachi Hassan, 1983
Blastocystis hominis : Etudes morphologiques par microscopie optique et électronique.
Bull. Soc. Path. Ex. 76, p. 766-776.

- Wéri, M., 1983
Notes de protozoologie.
Ed. J. Goemaere.

- Zierdt, C.H., Rude, W.S. and Bull, B.S., 1967
Protozoan characteristics of Blastocystis hominis.
Am. J. Pathol. 48, p. 495-501.

- Zierdt, C.H., 1973
Studies of Blastocystis hominis.
J. Protozool. 20, p. 114-121.

- Zierdt, C.H. and Milliams, R.L., 1974
Axenic cultivation of Blastocystis hominis.
Exper. Parasitol. 36, p. 233-343.

- Zierdt, C.H. and Tan H.K., 1976
Endosymbiosis in Blastocystis hominis.
Exper. Parasitology 39, p. 422-430.

- Zierdt, C.H. and Tan, H.K., 1976
Ultrastructure and light microscope appearance of Blastocystis hominis in patient with enteric disease.
Z. Parazitenk. 50, p. 277-283.

- Zierdt, C.H., 1978
Blastocystis hominis, an intestinal protozoan parasite of man.
Public Health Lab. 36, p. 146-161.

- Zierdt, C.H. and Swann J.C., 1981
Generation time and growth rate of the human intestinal parasite : Blastocystis hominis.
J. Protozool. 28, p. 483-485.