



**HAL**  
open science

# Epidémiologie, circulation, colonisation du parasite entérique unicellulaire *Blastocystis* sp.

Amandine Cian

► **To cite this version:**

Amandine Cian. Epidémiologie, circulation, colonisation du parasite entérique unicellulaire *Blastocystis* sp.. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S029 . tel-01508631

**HAL Id: tel-01508631**

**<https://theses.hal.science/tel-01508631v1>**

Submitted on 14 Apr 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



COLLEGE DOCTORAL

École Doctorale  
BIOLOGIE SANTÉ



# Thèse

Pour l'obtention du grade de Docteur délivré  
Par l'Université de Lille 2

Spécialité : Parasitologie

Présentée et soutenue publiquement par  
**Amandine CIAN**

Le 8 décembre 2016

## **Prévalence, circulation et colonisation du protozoaire entérique *Blastocystis* sp.**

### **Membres du jury**

#### Rapporteurs :

**Pr. Isabelle FLORENT** (PU, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris)  
**Dr. Christine COUSTAU** (DR CNRS, Institut Sophia AgroBiotech, Nice)

#### Examineurs :

**Dr. Hicham EL ALAOUI** (MCU, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)  
**Pr. Sébastien MONCHY** (PU, Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux)

#### Directeur de thèse :

**Dr. Eric VISCOGLIOSI** (DR CNRS, Institut Pasteur de Lille, Lille)

#### Co-directrice de thèse :

**Dr. Magali CHABE** (MCU, Université de Lille 2, Lille)

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL)

Institut Pasteur de Lille,

Inserm U1019, CNRS UMR 8204, CHU de Lille, Université de Lille,

Equipe 3 : Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE)

1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex

# REMERCIEMENTS

Parce qu'une thèse ne peut être réalisée seule, je souhaiterais remercier toutes les personnes ayant de près ou de loin participé à cette aventure. Veuillez m'excuser par avance des oublis éventuels...

## *Aux membres du jury*

**Aux Dr Isabelle FLORENT et Dr Christine COUSTAU**, veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir pris de votre temps pour le juger.

**Aux Dr Hicham El ALAOUI et Pr Sébastien MONCHY**, soyez assurés de mon profond respect et de mes sincères remerciements pour votre présence aujourd'hui mais également lors de mes différents comités de suivis de thèse. Votre soutien m'a été très précieux.

Au **Dr Magali CHABE**, merci pour ton soutien ainsi que pour le temps que tu m'as accordé lors de nos discussions qu'elles soient d'ordres scientifique ou personnel. On ne peut pas dire que « Blasto » nous ait facilités la vie...

Au **Dr Eric VISCOGLIOSI**, un grand merci à mon directeur de thèse pour son soutien durant toutes ces années ! Sans ta confiance et tes encouragements, cette thèse n'aurait pas eu lieu. Tu as cru en mes capacités et j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Je n'oublierai jamais le temps que tu as pu me consacrer malgré les responsabilités inhérentes à ta fonction de directeur de laboratoire.

## *Aux institutions et administratifs du CIIL*

Je tiens à remercier l'**Institut Pasteur de Lille** ainsi que l'**Université de Lille 2** pour avoir soutenu financièrement ce travail de thèse.

Merci à **Zarifé, Marie-Christine et Lurdes** du CIIL pour votre soutien permanent.

Je remercie également l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille et en particulier **Madame Laurence FOFANA** et **Monsieur François DELCROIX** pour leur disponibilité et leur aide.

## *Aux collaborateurs,*

Merci également à toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion de collaborer et qui ont bien voulu partager leurs savoirs et leurs compétences

# REMERCIEMENTS

**Madame CREUSY** pour les analyses histologiques réalisées et le temps que vous m'avez accordé pour interpréter les observations avec moi.

**Baptiste DELAIRE** pour ta disponibilité, ta patience, tes conseils mais aussi les « prêts de table ».

La Plateforme de Hautes Technologies Animales à l'Institut Pasteur de Lille. Merci à **Thierry CHASSAT** pour ta disponibilité et tes conseils lors de la mise en place des demandes d'autorisation de projet. Un grand merci à **Anthony MOURAY**, tu as toujours répondu présent quand j'en ai eu besoin et su me conseiller et m'aider à plusieurs reprises. J'en profite également pour remercier tout le personnel de l'animalerie sans lequel ce type de projet ne pourrait se faire et en particulier **Nicolas VANDENABEELE** et **Sarah LAPIERE**.

Nos collègues clermontois et en particulier **Ivan WAWRZYNIAK** et **Philippe POIRIER** pour nos collaborations enrichissantes.

A nos collègues hollandais **Tom VAN GOOL**, **Aldert BART**, **Ellen WENTING** et **Nienke VARHAAR** pour avoir pris le temps de m'accueillir afin de me former à la culture de *Blastocystis*.

Merci aux « Biopuces », **David HOT**, **Sékolène CABOCHE**, **Alexandre d'HALLUIN**, **Delphine BEURY** ainsi que les « GD », **Christophe AUDEBERT**, **Sophie MERLIN**, **Ludivine LIETAR**, **Gaël EVEN**, **Alexandre LOYWICK**, **Léa SIEGWALD** pour leur disponibilité, leur aide et leur sympathie.

Merci également aux personnels des 2 zoos français et en particulier à **Romain MORINIERE** qui a su se rendre disponible à plusieurs reprises.

**Loïc FAVENNEC**, merci d'avoir spontanément proposé de m'accueillir dans votre laboratoire pour me former au génotypage de *Giardia*. Merci également à votre équipe (**Romy RAZAKANDRAINIBE**, **François DUVAL**...) pour leurs disponibilités et leurs aides. Merci à vous tous pour la visite de la ville, j'ai passé de très bons moments à Rouen.

## *A mes collègues de l'équipe et au centre*

Merci à mon équipe pour tous les moments partagés.

**Gabriela CERTAD**, pour ta disponibilité, ta patience, ton aide, ton optimisme et tes encouragements. Dorénavant, il n'y aura plus de bataille pour la dernière qui quittera le labo. Rendez-vous à Match :-D

# REMERCIEMENTS

**Sadia BENAMROUZ**, pour ton soutien et ton aide en particulier en histologie. Tu as toujours su prendre le temps pour m'accompagner et me guider quand cela a été nécessaire, merci. Ton calme est une qualité que j'ai beaucoup appréciée car tu m'as souvent aidé à relativiser.

**Karine GUYOT**, même si nous n'avons pas eu l'occasion de travailler ensemble, nos discussions « labo » comme privées me manqueront. J'espère que les « manip sphéroïdes » aboutiront.

**Nausicaa GANTOIS**, sans toi les journées au labo auraient été trop calmes. Merci pour ton dynamisme, ton soutien et ton aide à tout niveau. Les systèmes « D » à la Nono vont me manquer.

Je tiens également à remercier tous les étudiants du laboratoire.

Ma voisine de bureau, **Dima El SAFADI**, les moments que nous avons pu partager me manquent,

**Sarah KHALIFE, Marwan OSMAN, Yuwalee SEESAO**, merci pour les moments partagés

**Linh N'GUYEN**, ma nouvelle voisine de bureau. Entre la chasse aux œufs avec Yuwalee dans le labo et ton ami « carré vert » dont tu ne sais plus te passer, je garderai de très bon souvenirs.

**Stéphanie GREIGE**, grâce à toi la mode robe de soirée/basket n'a plus de secret ;-)

**Martha BAYDOUN** *je te remercie de tout cœur. L'alphabet humain ne pourra jamais exprimer ma gratitude pour toi. Martha tu es adorable, merci pour ta bonne humeur quotidienne, ton soutien sans faille, ta générosité sans compter. Martha tu es unique ! Il n'y a que toi pour dicter les remerciements qui te reviennent ;-)* Même si tu viens de faire ton éloge, je te remercie pour les discussions et les moments que nous avons pu avoir ensemble et surtout je te fais plein de câlins !!!!

Un énorme merci à **Ludovic HUOT, Stéphanie SLUPEK, Elisabeth FACON**, sans vous les déjeuners n'auraient pas eu le même goût. Babeth, tu as toujours su gérer mes urgences... ainsi que mes idées farfelues qui nous ont valu de bonnes parties de rigolades en observant le résultat. Nos discussions durant le café du matin vont me manquer. Ludo et Steph, que ce soit au niveau scientifique ou personnel vous avez toujours su répondre présents et je ne peux que vous remercier pour votre soutien, votre aide et vos conseils.

## REMERCIEMENTS



**Joanne BALSAMELLI**, merci pour ton soutien, ton écoute et ta disponibilité. J'en profite également pour remercier les autres personnes de ton équipe et en particulier **Patricia DE NADAI**, grâce à toi graphpad est devenu mon ami !

*Aux amis et à ma famille,*

Un grand merci à **mes amis** qui ont été présents et m'ont soutenue durant ces 4 dernières années.

Je souhaiterais également remercier profondément **ma famille** sans qui tout cela n'aurait pu se faire. Merci à vous pour votre amour, vos encouragements et votre soutien inconditionnel ! Merci de m'avoir donnée les moyens de réussir. Merci à **mon chéri** de m'avoir supporté pendant mes longues périodes de stress. Ta présence quotidienne m'a permis de tenir le choc et tu as toujours su me faire rire quand j'en avais vraiment besoin. Je vous aime !

## RESUME



Les protozooses digestives touchent des centaines de millions d'individus par an et restent une des premières causes de morbidité, de malnutrition et de mortalité dans le monde. Cependant, la biologie de certains protozoaires entériques comme *Blastocystis* sp. n'est pas bien connue et ce microorganisme reste négligé par les autorités sanitaires. Brièvement, ce parasite colonise le tractus intestinal de l'Homme et de nombreux animaux. Son principal mode de transmission est la voie féco-orale et sa prévalence peut dépasser 50% dans les pays en voie de développement. Il présente une très grande diversité génétique avec 17 sous-types (STs) identifiés à ce jour. Son pouvoir pathogène est longtemps resté controversé mais un large faisceau de données récentes suggère que l'infection à *Blastocystis* sp. est associée à une variété de troubles gastro-intestinaux et de l'urticaire.

Dans le cadre de ma thèse, des études épidémiologiques ont été menées dans différents pays afin de déterminer la prévalence de ce parasite dans la population humaine et identifier des facteurs de risque d'infection. En parallèle, à travers une enquête dans des zoos français, des réservoirs animaux de transmission zoonotique du parasite ont été proposés. D'autre part, les mécanismes impliqués dans la colonisation de l'hôte par *Blastocystis* sp. ont été étudiés.

Des enquêtes épidémiologiques ont ainsi été réalisées au Liban, au Sénégal et en France. Le parasite a été recherché dans les selles par PCR en temps réel ciblant un domaine du gène de l'ADNr 18S et l'amplicon obtenu a été séquencé pour le sous-typage de l'isolat correspondant. La première étude menée au Liban dans la région de Tripoli a montré une prévalence de 19% dans la population générale mais cette prévalence atteignait 60% dans une population d'écoliers vivant dans la même région. Une prévalence de 100% a été obtenue dans une cohorte d'enfants sénégalais. Les fortes prévalences observées dans ces pays s'expliquent par des conditions d'hygiène très précaires en lien avec le péril fécal. En termes de distribution des STs, le ST3 était prédominant dans ces deux pays suivi des ST1 et ST2. Dans une étude multicentrique menée en France, une prévalence globale de 18,3% a été obtenue avec une prédominance du ST3 suivi des ST1, ST4 et ST2. Cette distribution est aussi celle observée dans une majorité de pays européens. Le ST4 est fréquent en Europe et rare ou absent dans les autres continents ce qui suggérerait son émergence récente dans la population européenne. Dans l'étude française, la prévalence du parasite est significativement plus importante en été qu'en hiver. D'autres variables comme un voyage récent et l'âge ont été identifiés comme des facteurs de risque de transmission du parasite. Le contact avec des animaux peut représenter un autre facteur de risque du fait du potentiel zoonotique avéré du parasite. Dans une large étude épidémiologique réalisée dans deux zoos français sur plus de

## RESUME

160 espèces animales, la prévalence globale de *Blastocystis* sp. dépasse 30% avec des variations importantes selon les groupes d'animaux. En comparant la distribution des STs chez l'Homme et chez les différents groupes d'animaux, les primates, les artiodactyles (bovins et cochons) et les oiseaux représenteraient les principaux réservoirs potentiels d'infection pour l'Homme.

Une association entre l'infection à *Blastocystis* sp. et l'appendicite a été mise en évidence chez une enfant au Maroc confirmant ainsi la pathogénie et le potentiel invasif et inflammatoire du parasite. De plus, 26 autres membres de sa famille ont présenté des symptômes digestifs suggérant une épidémie de blastocystose d'origine hydrique. L'hypothèse d'une relation entre ST de *Blastocystis* sp. et pouvoir pathogène a été émise d'où l'intérêt d'une étude de génomique comparative afin d'identifier des facteurs de virulence pouvant être présents ou absents pour certains STs. A ce jour, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le génome de ST4 séquencé durant ma thèse et celui de ST7 disponible dans les bases de données alors que ces STs présentent une virulence variable *in vitro*. Enfin, l'impact encore inconnu de la colonisation par *Blastocystis* sp. sur la composition du microbiote intestinal humain a été évalué. Les compositions des microbiotes bactériens de 96 patients infectés ou non par *Blastocystis* sp. ont été obtenus par séquençage à haut-débit et comparés. Une diversité bactérienne plus élevée a été trouvée chez les patients colonisés par rapport aux patients non infectés. Ces données suggèrent que la colonisation par *Blastocystis* sp. ne serait pas associée à une dysbiose intestinale généralement observée dans les maladies infectieuses intestinales mais plutôt à un microbiote intestinal sain.



## ABSTRACT



Digestive protozoan infections affect hundreds of millions of people annually and are a major cause of morbidity, malnutrition and mortality worldwide. However, the biology of some enteric protozoa as *Blastocystis* sp. is not well known and these microorganisms remain still neglected by the health authorities. Briefly, this parasite colonizes the intestinal tract of humans and various animals. Its main mode of transmission is the fecal-oral route and its prevalence can exceed 50% in developing countries. It exhibits a large genetic diversity with 17 subtypes (STs) identified to date. Its pathogenicity has long been controversial, but recent data suggest that infection with *Blastocystis* sp. is associated with a variety of gastrointestinal disorders and urticaria.

As part of my thesis, epidemiological studies have been conducted in different countries to determine the prevalence of this parasite in the human population and identify risk factors for infection. In parallel, through a survey in French zoos, animal reservoirs of zoonotic transmission of *Blastocystis* sp. have been proposed. Moreover, mechanisms involved in the colonization of the host by the parasite were studied.

Epidemiological surveys were conducted in Lebanon, Senegal and France. The parasite was identified in faecal samples by real-time PCR targeting the 18S rDNA gene and the resulting amplicon was sequenced for subtyping of the corresponding isolate. The first study conducted in Lebanon in the Tripoli area showed a prevalence of 19% in the general population but this prevalence reached 60% in a population of school children living in the same region. A prevalence of 100% was obtained in a cohort of Senegalese children. The high prevalence observed in these countries can be explained by poor hygiene conditions in connection with the faecal peril. In terms of distribution of STs, the ST3 was predominant in both countries followed by ST1 and ST2. In a multicenter study conducted in France, an overall prevalence of 18.3% was obtained with a predominance of ST3, followed by ST1, ST2 and ST4. This distribution was quite similar to that observed in most European countries. The ST4 is common in Europe and rare or absent in other continents which would suggest its recent emergence in the European population. In the French study, parasite prevalence was significantly higher in summer than in winter. Other variables such as a recent trip and age have been identified as risk factors for transmission of the parasite. The contact with animals may represent another risk factor because of the zoonotic potential of the parasite. In a large epidemiological study conducted in two French zoos and including over 160 animal species, the overall prevalence of *Blastocystis* sp. exceeded 30% with significant variations between animal groups. By comparing the distribution of STs between humans and different groups of

## ABSTRACT



animals, primates, artiodactyls (cattle and pigs) and birds represent major potential reservoirs of infection for humans.

An association between infection with *Blastocystis* sp. and appendicitis was demonstrated in a child in Morocco confirming the pathogenicity and invasive and inflammatory potential of the parasite. In addition, 26 other family members presented digestive symptoms suggesting waterborne outbreak of blastocystosis. The hypothesis of a relationship between *Blastocystis* sp. ST and pathogenicity was suggested hence the interest of a comparative genomics study to identify virulence factors that may be present or absent for some STs. No significant difference was found between the ST4 genome sequenced during my thesis and the ST7 genome available in the database while these STs show different virulence *in vitro*. Finally, the unknown impact of colonization by *Blastocystis* sp. on the composition of the human intestinal microbiota was evaluated. The compositions of the bacterial microbiota of 96 patients infected or not by *Blastocystis* sp. were obtained by high-throughput sequencing and compared. A higher bacterial diversity was found in colonized patients compared to non-infected patients. These data suggested that colonization by *Blastocystis* sp. should not be associated with dysbiosis generally observed in intestinal infectious diseases but rather to a healthy intestinal microbiota.

## ABREVIATIONS

16S rDNA	16S ribosomal DNA
16S rRNA	16S ribosomal RNA
ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Acide Desoxyribonucléique
AIC	Akaike information criterion
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ANOSIM	Analysis of similarity
ARNr 18S	Acide ribonucléique de la petite sous unité ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BDPEE	Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BP	Boostrap proportion
BPP	Bayesian Posterior Probabilities
BRF	<i>Blastocystis</i> Research Foundation
CAGs	Co-abundance gene groups
CEA	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
CE-IVD	Conformité européenne - <i>In vitro</i> diagnostic
CD4	Cluster de différenciation 4
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universtaire
CI	Confidence Interval
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de Carbone
DLM	Direct light microscopy
DNA	Deoxyribose nucleic acid
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DSS	Sodium Sulfate de Dextran
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EPLS	Espoir Pour La Santé
GB	Gigabyte
GEMS	Global Enteric Multicenter Study
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
Gp60	Glycoprotéine 60kDa
HES	Hématoxyline-Eosine-Safranine

## ABREVIATIONS

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSES	High socioeconomic status
HTS	High-Throughput Sequencing
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBS	Irritable Bowel Syndrome
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
kb	Kilobase
LSES	Low socioeconomic status
LSU rRNA	Large subunit ribosomal RNA
Mb	Mégabase
MCL	Maximum Composite Likelihood
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de Magnésium
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MIF	Merthiolate-Iode-Formol
Mpb	Millions de paires de bases
MDR	Multi drug resistance
MetaHIT	Metagenomics of the Human Intestinal Tract
MLO	Mitochondrion-Like Organelles
MNHN	Musée National d'Histoire Naturelle
MSF	Major Facilitator Transporter
MU	Mixed ST / Untypable
MWW	Mann-Whitney-Wilcoxon
MZN	Modified Zhiel Neelsen
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHP	Non-human primate
NF-kB	Nuclear Factor kappa B
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
NMAST	Non-mammalian and avian ST
NRPS	Non Ribosomal peptide synthetase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

## ABREVIATIONS



OR	odds ratio
OTU	Operational taxonomic unit
PCA	Principal Component Analysis
PCoA	Principal Coordinates Analysis
pb	paire de bases
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGM	Personal Genome Machine
PHC	Projet Hubert Curien
PLETHA	Plateforme d'Expérimentation et de Hautes Technologies Animales
PKS	Polyketide synthase
qPCR	PCR quantitative
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RCH	Rectocolite hémorragique
RDP	Ribosomal Database Project
RR	Relative risks
sp.	Espèce
SII	Syndrome de l'intestin irritable
SSU rDNA	Small subunit ribosomal DNA
SSU rRNA	Small subunit ribosomal RNA
ST	Sous-type
S.T.A.R	Stool Transport and Recovery
STS-PCR	Sequence Tagged Site-PCR
TBE	Tris–Borate-EDTA
Th	T helper
TMP-SMX	Triméthopine-Sulfaméthoxazole
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPI	Triose-phosphate isomerase
WHO	World Health Organization
WMA	World Medical Association
ZO	Zona occludens

## PUBLICATIONS

Mon travail de thèse a été valorisé par les publications suivantes :

✓ **Cian A.\***, El Safadi D.\*, Osman M.\*, Moriniere R., Gantois N., Benamrouz-Vanneste S., Delgado-Viscogliosi P., Guyot K., Li L.L., Monchy S., Noël C., Poirier P., Nourrisson C., Wawrzyniak I., Delbac F., Bosc S., Chabé M., Petit T., Certad G., Viscogliosi E. 2016. Molecular epidemiology of *Blastocystis* spp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE* soumis

\* Co-premiers auteurs

✓ El Safadi D.\*, **Cian A.\***, Nourrisson C., Pereira B., Morelle C., Bastien P., Bellanger AP., Botterel B., Candolfi E., Desoubeaux G., Lachaud L., Morio F., Pomares C., Rabodonirina M., Wawrzyniak I., Delbac F., Gantois N., Certad G., Delhaes L., Poirier P., Viscogliosi E. 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* from a large-scale multicenter study in France. *BMC Infect Dis* 16(1):451

\* Co-premiers auteurs

✓ **Cian A.**, El Safadi D., Nourrisson C., Frealle., Dutoit E., Wawrzyniak I., Gantois N., Delbac F., Chabé M., Certad G., Poirier P., Viscogliosi E. 2016. *Blastocystis*, un protozoaire entérique émergent. *Feuillets de Biologie* 331:55-68

✓ Nourrisson C., Wawrzyniak I., **Cian A.**, Livrelli V., Viscogliosi E., Delbac F., Poirier P. 2016. On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology* sous presse (DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182016001396>)

✓ Osman M.\*, El Safadi D.\*, **Cian A.\***, Benamrouz S., Nourrisson C., Poirier P., Pereira B., Razakandrainibe R., Pinon A., Lambert C., Wawrzyniak I., Dabboussi F., Delbac F., Favennec L., Hamze M., Viscogliosi E., Certad G. 2016 Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis* 10(4):e0004643

\* Co-premiers auteurs

## PUBLICATIONS

✓ Audebert C., Even G., **Cian A.**, The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick A., Merlin S., Viscogliosi E., Chabé M. 2016. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep* 6:25255

✓ Wawrzyniak I., Courtine D., Osman M., Hubans-Pierlot C., **Cian A.**, Nourisson C., Chabe M., Poirier P., Bart A., Polonais V., Delgado-Viscogliosi P., El Alaoui H., Belkorchia A., Van Gool T., Tan K.S.W., Ferreira S., Viscogliosi E., Delbac F. 2015. Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genom Data* 4:22-23

✓ Fréalle E.\*, El Safadi D.\*, **Cian A.**, Aubry E., Certad G., Osman M., Wacrenier A., Dutoit E., Creusy C., Dubos F., Viscogliosi E. 2014. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg Infect Dis* 21(1):91-94

\* Co-premiers auteurs

✓ Nourisson C., Scanzi J., Pereira B., NkoudMongo C., Wawrzyniak I., **Cian A.**, Viscogliosi E., Livrelli V., Delbac F., Dapoigny M., Poirier P. 2014. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparison between patients with Irritable Bowel Syndrome and asymptomatic subjects. *PLoS ONE* 9(11):e111868

✓ El Safadi D., Gaayeb L., Meloni D., **Cian A.**, Poirier P., Wawrzyniak I., Delbac F., Dabboussi F., Delhaes L., Seck M., Hamze M., Riveau G., Viscogliosi E. 2014. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis* 14:164 (highly accessed)

✓ El Safadi D., Meloni D., Poirier P., Osman M., **Cian A.**, Gaayeb L., Wawrzyniak I., Delbac F., El Alaoui H., Delhaes L., Dei-Cas E., Mallat H., Dabboussi F., Hamze M., Viscogliosi E. 2013. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg* 88(6):1203-1206

## PUBLICATIONS

### Trois autres articles ont été publiés dans le cadre d'activités d'expertise:

✓ Landman W.J., Molenaar R.J., **Cian A.**, van der Heijden H.M., Viscogliosi E. 2016. Granuloma disease in flocks of productive layers caused by *Tetratrichomonas gallinarum*. *Avian Pathol* 45(4):465-477

✓ Grellet A., Polack B., Feugier A., Boucraut-Baralon C., Grandjean D., Vandewynckel L., **Cian A.**, Meloni D., Viscogliosi E. 2013. Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. *Vet Parasitol* 197(3-4):418-426

✓ Profizi C., **Cian A.**, Meloni D., Hugonnard M., Lambert V., Groud K., Gagnon AC., Viscogliosi E., Zenner L. 2013. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. *Vet Parasitol* 196(1-2):50-55

### Autres publications:

✓ Monchy S., Sanciu G., Jobard M., Rasconi S., Gerphagnon M., Chabé M., **Cian A.**, Meloni D., Niquil N., Christaki U., Viscogliosi E., Sime-Ngando T. 2011. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. *Environ Microbiol* 13(6):1433-1453

✓ Souppart L., Moussa H., **Cian A.**, Sanciu G., Poirier P., El Alaoui H., Delbac F., Boorum K., Delhaes L., Dei-Cas E., Viscogliosi E. 2010. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* 106(2):505-511

✓ Souppart L., Sanciu G., **Cian A.**, Wawrzyniak I., Delbac F., Capron M., Dei-Cas E., Boorum K., Delhaes L., Viscogliosi E. 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* 105(2):413-421



## COMMUNICATIONS



**Mon travail de thèse a pour l'instant donné lieu aux communications suivantes dans des congrès nationaux et internationaux:**

**2016.** 13<sup>th</sup> International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID XIII 2016), Anvers, Belgique. **Cian A.**, El Safadi D., Nourrisson C., Pereira B., The *Blastocystis* Investigation Group., Wawrzyniak I., Delbac F., Gantois N., Certad G., Delhaes L., Poirier P., Viscogliosi E. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* spp. from a large-scale multicenter study in France. Communication affichée.

**2016.** 13<sup>th</sup> International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID XIII 2016), Anvers, Belgique. **Cian A.**, El Safadi D., Osman M., Delgado-Viscogliosi P., Morinière R., Benamrouz-Vanneste S., Guyot K., Chabé M., Petit T., Certad G., Viscogliosi E. Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of zoonotic risk. Communication affichée.

**2016.** 13<sup>th</sup> International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID XIII 2016), Anvers, Belgique. **Cian A.**, Osman M., El Safadi D., Benamrouz-Vanneste S., Nourrisson C., Poirier P., Pereira B., Razakandrainibe R., Pinon A., Lambert C., Wawrzyniak I., Daboussi F., Delbac F., Favennec L., Hamze M., Viscogliosi E., Certad G. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. Communication affichée.

**2016.** 13<sup>th</sup> International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID XIII 2016), Anvers, Belgique. Gantois N., **Cian A.**, Benamrouz S., Seesao Y., Delaire B., Creusy C., Gay M., Aliouat-Denis C.M., Viscogliosi E., Certad G. Identification of *Blastocystis* and *Cryptosporidium* species in marine fish from northern France. Communication affichée.

**2015.** 2<sup>èmes</sup> journées Franco-Maghrébines de Parasitologie Mycologie, Tunis, Tunisie. **Cian A.**, El Safadi D., Poirier P., Delhaes L., Gantois N., Chabe M., Viscogliosi E. Epidémiologie moléculaire et transmission du parasite *Blastocystis* sp. en France. Communication orale.

## COMMUNICATIONS

2015. 15<sup>ème</sup> journée André Verbert, Faculté de Médecine, Lille, France. **Cian A.**, El Safadi D., Gantois N., Viscogliosi E. Molecular epidemiology and transmission of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. in France. Communication affichée.

2015. XIX<sup>th</sup> World Veterinary Poultry Association Congress (WVPAC), Cape Town, Afrique du Sud. Molenaar R.J., **Cian A.**, Van der Heijden H.M.J.F., Viscogliosi E., Landman W.J.M. Outbreaks of granuloma disease in layer flocks associated with *Tetratrichomonas gallinarum* and experimental reproduction of the condition. Communication affichée.

2014. 9<sup>th</sup> Dubai International Food Safety Conference, Dubai, Emirats Arabes Unis. Osman M., El Safadi D., Benamrouz S., Guyot K., Fréalle E., El Omari K., El Cheikh D., Khairallah C., **Cian A.**, Aliouat E.M., Delhaes L., Hamze M., Certad G., Dabboussi F., Viscogliosi E. New insights into the molecular epidemiology and transmission dynamics of *Cryptosporidium* sp. and *Blastocystis* sp. in North Lebanon. Communication affichée.

2014. 24<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelone, Espagne. High prevalence of *Blastocystis* in irritable bowel syndrome patients is associated with changes in gut microbiota composition. Nourisson C., Scanzi J., Pereira B., Nkoud Mongo C., Wawrzyniak I., **Cian A.**, Viscogliosi E., Livrelli V., Delbac F., Dapoigny M., Poirier P. Communication affichée.

2014. The Bioinformatics for Environmental Genomics Workshop, Lyon, France. Wawrzyniak I., Courtine D., Nourisson C., Poirier P., **Cian A.**, Bart A., Chabe M., Siegwald L., Polonais V., Belkorchia A., Van Gool T., Viscogliosi E., Delbac F. Draft genome sequence of the anaerobic intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4. Communication affichée.

2013. 1<sup>ères</sup> Journées Franco-Maghrébines de Parasitologie et Mycologie, Rabat, Maroc. El Safadi D., Osman M., **Cian A.**, Delhaes L., Dabboussi F., Hamze M., Viscogliosi E. Epidémiologie moléculaire du parasite *Blastocystis* au Liban. Communication affichée.

## COMMUNICATIONS



### **Autres communications en lien avec mes activités d'expertise:**

**2012.** XI<sup>th</sup> European Multicolloquium of Parasitology (EMOP), Cluj-Napoca, Roumanie. Grellet A., Robin D., Meloni D., **Cian A.**, Viscogliosi E., Polack B. Prevalence and risk factors of trichomonads infection in puppies from brench breeding kennels. Communication affichée.

**2012.** XI<sup>th</sup> European Multicolloquium of Parasitology (EMOP), Cluj-Napoca, Roumanie. Grellet A., Diallo L., Carrez B., Meloni D., **Cian A.**, Viscogliosi E., Polack B. Risk factors of *Pentatrichomonas hominis* infection in puppies from a large breeding kennel and impact on feces quality. Communication affichée.

# FORMATIONS

Durant ma thèse, j'ai eu la possibilité de participer aux formations suivantes :

- ✓ « **Notions fondamentales en statistiques incluant spécificité des petits échantillons** », Université de Lille 2, Lille, le 11 mars et du 23 au 25 mars 2016 (28h)
- ✓ Formation pratique « **Génotypage du parasite *Giardia*** », EA3800 Université de Rouen, Rouen, du 23 au 27 novembre 2015 (28h)
- ✓ « **Génétique et animalerie : production, utilisation, conservation des colonies** », Institut de Biologie de Lille, Lille, le 2 juin 2015 (6h)
- ✓ « **Transfection et transduction de cellules eucaryotes en culture : surexpression et répression de gènes** » UMR 0991, Rennes, du 25 au 28 novembre 2014 (28h)
- ✓ « **Expérimentation animale de niveau II** », Institut Pasteur de Lille, Lille, du 15 au 23 septembre 2014 (40h30)
- ✓ Formation théorique « **Risque biologique en laboratoire et animalerie de confinement NSB2 et 3\*** », Institut de Biologie de Lille, Lille, les 25 et 27 juin 2014 (8h)
- ✓ Atelier « **Anglais Module 1** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq, du 5 février au 30 avril 2014 (30h)
- ✓ Atelier « **Veille et stratégie de recherche documentaire** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Université de Lille 2, Lille, le 3 avril 2014 (3h)
- ✓ Atelier « **Gérer efficacement sa documentation avec Zotero** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Cité Scientifique, Villeneuve d'Ascq, le 25 mars 2014 (3h)
- ✓ Atelier « **Bien utiliser les indicateurs bibliométriques en Biologie-Santé** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Université de Lille 2, Lille, le 12 janvier 2014 (2h)
- ✓ Atelier « **Practice makes perfect** », Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille, Université de Lille 2, Lille, de octobre 2013 à avril 2014 (15h)

## FORMATIONS



✓ Formation pratique « **Technique de culture du parasite *Blastocystis sp.*** », Academisch Medisch Centrum d'Amsterdam (Laboratoire de Tom van Gool), Pays-Bas, les 14 et 15 novembre 2013 (7h)

✓ Formation pratique « **Production et purification de protéines** », Université Libre de Bruxelles, Gosselies (Laboratoire de René Wintjens), Belgique, du 15 au 18 octobre 2013 (28h)

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
1. <i>Blastocystis</i> , un protozoaire entérique émergent (Article 1) .....	4
I. – Introduction .....	6
II. – Polymorphisme, cycle biologique et culture de <i>Blastocystis</i> .....	6
III. – Taxonomie et diversité génétique de <i>Blastocystis</i> .....	7
A) Découverte de <i>Blastocystis</i> et émergence au sein des eucaryotes .....	7
B) Classification du genre <i>Blastocystis</i> .....	8
IV. – Détection de <i>Blastocystis</i> dans les échantillons biologiques .....	9
A) Diagnostic microscopique.....	9
B) Diagnostic par culture du parasite.....	10
C) Recherche de copro-antigènes.....	10
D) Diagnostic moléculaire .....	10
E) Sous-typage des isolats.....	11
V. – Prévalence de <i>Blastocystis</i> dans la population humaine .....	12
VI. – Distribution des STs de <i>Blastocystis</i> dans la population humaine .....	15
VII. – Prévalence et distribution des STs dans la population animale et potentiel zoonotique de <i>Blastocystis</i> .....	16
VIII. – Modes de transmission de <i>Blastocystis</i> .....	17
IX. – Molécules et mécanismes impliqués dans la pathogénicité de <i>Blastocystis</i> .....	18
A) Génomes et prédiction de protéines impliquées dans l'interaction hôte parasite .....	18
B) Physiopathologie de la parasitose .....	19
X. – Impact de <i>Blastocystis</i> en santé humaine.....	21
A) Blastocystose et troubles digestifs .....	21
B) Blastocystose et immunodépression .....	22
C) Blastocystose et urticaire.....	23
D) Corrélation entre STs de <i>Blastocystis</i> et pathogénicité.....	23
XI. – Traitement de la blastocystose.....	24
XII. – Conclusion.....	24
2. <i>Blastocystis</i> sp. et le microbiote intestinal.....	35

# SOMMAIRE

3. Génomes nucléaire et « mitochondrial » de <i>Blastocystis</i> sp.....	38
I. - Le génome nucléaire .....	39
II. - Le génome « mitochondrial » .....	41
4. Modèles animaux de blastocystose.....	42
<b>RESULTATS.....</b>	<b>46</b>
1. Epidémiologie moléculaire de <i>Blastocystis</i> sp. dans la population humaine et identification de facteurs de risque de transmission du parasite.....	46
I-. Enquêtes épidémiologiques au Liban.....	46
A) Dans la population générale.....	46
a. Introduction .....	46
b. Résultats .....	46
c. Conclusion.....	47
Article 2.....	48
B) Dans une population d'écoliers au Liban.....	57
a. Introduction .....	57
b. Résultats .....	57
c. Conclusion.....	57
Article 3.....	59
II-. Enquête épidémiologique dans une population d'enfants au Sénégal.....	85
a. Introduction .....	85
b. Résultats .....	85
c. Conclusion.....	85
Article 4.....	87
III-. Enquête épidémiologique dans la population française .....	112
a. Introduction .....	112
b. Résultats .....	113
c. Conclusion.....	113
Article 5.....	114
2. Evaluation du potentiel zoonotique de <i>Blastocystis</i> sp.....	146
Enquête épidémiologique chez les animaux de zoos en France. ....	146
a. Introduction .....	146

# SOMMAIRE

b.	Résultats .....	146
c.	Conclusion .....	147
	Article 6.....	149
3.	Physiopathologie de <i>Blastocystis</i> sp. et facteurs de virulence.....	187
	I. Cas clinique d'appendicite liée à une colonisation par <i>Blastocystis</i> sp.....	187
	a. Introduction .....	187
	b. Résultats .....	187
	c. Conclusion .....	187
	Article 7.....	189
	II. Microbiote intestinal et colonisation par <i>Blastocystis</i> sp. ....	197
	a. Introduction .....	197
	b. Résultats .....	197
	c. Conclusion.....	197
	Article 8.....	199
	III. Développement d'un modèle animal de blastocystose .....	225
	A) Introduction .....	225
	B) Matériels et méthodes .....	225
	a. Cultures et contrôle de l'axénisation .....	225
	b. Autorisations de projets pour l'expérimentation animale.....	226
	c. Choix des animaux et contrôles avant infection.....	226
	d. Infections expérimentales par <i>Blastocystis</i> sp. ....	228
	C) Résultats .....	230
	a. Infection expérimentale avec un isolat de <i>Blastocystis</i> sp. de ST4 par voie orale.....	230
	b. Infection expérimentale avec des isolats de <i>Blastocystis</i> sp. de ST7 et ST8 par voie orale. ....	231
	c. Infection expérimentale avec un isolat de <i>Blastocystis</i> sp. de ST7 par voie intra- caecale.....	231
	D) Conclusion .....	231
	IV. Etude de génomique comparative.....	232
	a. Introduction .....	232
	b. Résultats .....	232



# SOMMAIRE



c. Conclusion.....	232
Article 9.....	234
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>241</b>
Situation de la blastocystose au Liban et plus globalement au Moyen-Orient .....	241
Situation de la blastocystose au Sénégal et plus globalement en Afrique .....	246
Situation de la blastocystose en France et plus globalement en Europe .....	247
Facteurs de risque de transmission de <i>Blastocystis</i> sp. ....	250
Prévalence de <i>Blastocystis</i> sp. dans différents groupes d'animaux et évaluation de son pouvoir zoonotique.....	251
Analyse du pouvoir pathogène et invasif de <i>Blastocystis</i> sp. à travers l'étude d'un cas clinique.....	256
<i>Blastocystis</i> sp. et microbiote intestinal .....	257
Développement d'un modèle animal de blastocystose .....	259
Apports de la génomique comparative.....	262
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>265</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>267</b>
<b>ANNEXES</b>	

# INTRODUCTION



L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 3,5 milliards d'individus à travers le monde sont affectés par des parasitoses intestinales et que 450 millions d'entre eux développent une pathologie en lien avec ces infections (OMS, 2010). Dans ce contexte global, même si l'impact des seules protozooses digestives dans la population humaine reste difficile à estimer avec précision, elles sont très probablement responsables de centaines de millions de cas par an en faisant ainsi une des premières causes de morbidité, de malnutrition et de mortalité dans le monde. Leur prévalence est principalement liée au péril fécal (transmission féco-orale) et de ce fait, les pays en voie de développement sont les plus concernés par ces parasitoses en lien avec des conditions sanitaires précaires. Cependant, ce péril s'est accru dans les pays développés en particulier à travers les séjours de leurs populations dans des pays à risque et les flux migratoires. A côté des protozoaires les plus connus comme *Entamoeba* et *Giardia*, d'autres unicellulaires parasites entériques comme *Blastocystis* et *Cryptosporidium* ont été identifiés mais demeurent généralement négligés par les autorités sanitaires. C'est donc sur ces deux protozoaires dont l'écologie et la physiopathologie restent encore très mal connues que se concentrent les travaux de mon équipe d'accueil (BDPEE).

Ma thèse s'est quant à elle focalisée sur *Blastocystis* sp. qui, brièvement, est un parasite cosmopolite identifié dans le tube digestif de l'Homme et de nombreux groupes d'animaux. Il est à ce jour le parasite eucaryote unicellulaire le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines puisque sa prévalence peut atteindre les 20% dans les pays développés et largement dépasser les 50% dans les pays en voie de développement. Dans son blog dédié à *Blastocystis* sp. (<http://www.blastocystis.net/>), Rune Stensvold du Statens Serum Institute de Copenhague au Danemark avance le nombre de 1 milliard d'individus qui pourraient être infectés par ce parasite à travers le monde. Un tel chiffre amène naturellement à la question de l'impact réel de *Blastocystis* sp. en santé publique. D'ailleurs, la dernière décennie a vu un intérêt croissant porté à ce protozoaire qui s'est traduit par l'augmentation significative du nombre annuel de publications sur ce parasite, la création de la *Blastocystis* Research Foundation (BRF) aux Etats-Unis (<http://www.bhomcenter.org/>) et l'ajout en 2006 par l'OMS de *Blastocystis* sp. sur la liste des parasites d'origine hydrique.

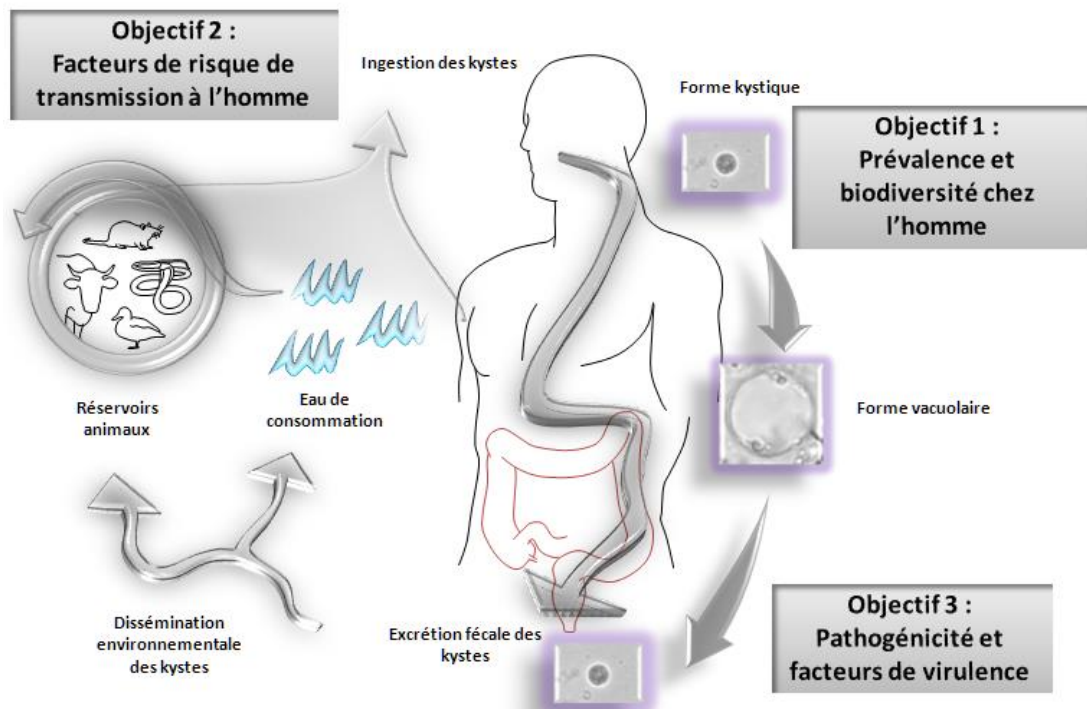
Jusqu'à récemment, le pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp. restait controversé du fait d'un portage asymptomatique très fréquent. Cependant, un large faisceau de données récentes qu'elles soient *in vivo*, *in vitro*, cliniques et génomiques tendent à démontrer le potentiel

# INTRODUCTION

pathogène de ce protozoaire et plusieurs molécules et mécanismes impliqués dans la physiopathologie du parasite ont été proposés. *Blastocystis* sp. serait ainsi responsable de symptômes digestifs non spécifiques tels que des diarrhées et des douleurs abdominales. D'autre part, ce parasite pourrait aussi jouer un rôle majeur dans une pathologie intestinale fréquente dans les pays industrialisés, le syndrome de l'intestin irritable (SII), dans l'apparition de lésions cutanées comme l'urticaire et serait fréquemment retrouvé chez les patients immunodéprimés en faisant ainsi un parasite opportuniste de tout premier plan. En outre, une large diversité génétique a été observée au sein du genre *Blastocystis* avec l'identification de nombreux sous-types (STs) dont les fréquences sont très variables dans la population humaine. Quelques études récentes, en particulier *in vitro*, suggèrent une virulence variable de ces différents STs mais cette hypothèse reste encore à confirmer.

Vu l'impact potentiel majeur de *Blastocystis* sp., différents axes de recherche ont été développés par l'équipe BDPEE sur ce parasite (**Figure A1**) qui ont la particularité de combiner « études de terrain » et « recherche de laboratoire ». En résumant, ils visent à clarifier l'épidémiologie moléculaire de ce parasite, sa circulation dans les populations humaine et animale comme dans l'environnement (recherche de facteurs de risque de transmission) et sa physiopathologie tout en identifiant les molécules et mécanismes impliqués dans sa pathogénie. La finalité de ces travaux est de pouvoir proposer des stratégies de contrôle et de lutte contre cette parasitose.

Les activités de recherche développées durant ma thèse se sont parfaitement intégrées dans ces trois axes de recherche. En effet, grâce au réseau de collaborations mis en place par BDPEE, des enquêtes épidémiologiques visant à déterminer la prévalence et la distribution des STs de *Blastocystis* sp. ont pu être menées dans différents pays comme le Liban, le Sénégal et la France, pays pour lesquels les données étaient encore limitées voire inexistantes. Dans ce cadre, des facteurs de risque de transmission du parasite ont pu être identifiés par le biais d'analyses statistiques utilisant les données personnelles et cliniques recueillies pour chaque patient. D'autre part, une large étude épidémiologique réalisée dans deux zoos français couplée aux données disponibles dans la littérature ont permis d'identifier plusieurs groupes d'animaux à risque de transmission zoonotique et de mieux appréhender la circulation du parasite. De plus, afin d'étayer nos connaissances sur la physiopathologie du parasite, un cas clinique d'appendicite associée à une blastocystose a été reporté et l'impact



**Figure A1:** Axes de recherche développés par l'équipe BDPEE sur *Blastocystis* sp. et dont les objectifs sont d'aboutir à une meilleure connaissance de l'épidémiologie moléculaire, de la circulation et de la pathogénie de ce parasite. Les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse se sont parfaitement intégrés dans ces 3 axes.

# INTRODUCTION



du parasite sur le microbiote intestinal humain a été pour la première fois analysé. En parallèle, le développement d'un modèle murin de blastocystose a été initié ainsi qu'une analyse de génomique comparative ayant pour but d'identifier des variations entre STs pouvant être en relation avec leur virulence respective.

Tous ces travaux menés sur *Blastocystis* sp. durant ma thèse ont apporté une contribution que l'on peut considérer comme significative à une meilleure connaissance de l'épidémiologie, de la circulation et de la pathogénie de ce parasite.

Enfin, à côté de mon projet de thèse, j'ai eu l'opportunité de m'impliquer dans les activités d'expertises de BDPEE et en particulier, celles portant sur l'identification moléculaire des trichomonadines d'intérêt vétérinaire chez différents groupes d'animaux (**Annexe I**).

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

*Préambule : Durant ma thèse, notre équipe a été sollicitée par la revue de biologie praticienne des « Feuilles de Biologie » (Editions Orion, Neuilly-sur-Seine, France) afin de rédiger un article de synthèse sur Blastocystis sp. Ce travail dans lequel je me suis grandement impliquée sert de support à mon analyse bibliographique. Cette analyse a été complétée par trois chapitres non développés dans cette revue et portant sur i) Blastocystis sp. et le microbiote intestinal, ii) Genomes nucléaire et « mitochondrial » de Blastocystis sp. et iii) Modèles animaux de blastocystose. D'autre part, ma thèse englobe toutes les figures et tables des articles insérés dans mon manuscrit selon leur numérotation dans l'article correspondant. Dans un esprit de clarté pour le lecteur, les figures et tables supplémentaires ne faisant pas partie de ces articles ont été respectivement nommées **Figure AX** et **Table AX**.*

## **1. Blastocystis, un protozoaire entérique émergent**

### **Article 1: Blastocystis, un protozoaire entérique émergent**

**A. CIAN<sup>1</sup>, D. EL SAFADI<sup>1,2</sup>, C. NOURRISSON<sup>3,4</sup>, E. FREALLE<sup>1,5</sup>, E. DUTOIT<sup>5</sup>, I. WAWRZYNIAK<sup>3</sup>, N. GANTOIS<sup>1</sup>, F. DELBAC<sup>3</sup>, M. CHABE<sup>1</sup>, G. CERTAD<sup>1,6</sup>, P. POIRIER<sup>3,4</sup>, E. VISCOGLIOSI<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Lille, France

<sup>2</sup> Centre AZM pour la recherche en biotechnologies et ses applications, Université Libanaise, Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement, Tripoli, Liban

<sup>3</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal-Université d'Auvergne-CNRS, UMR 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Gabriel-Montpied, Clermont-Ferrand, France

<sup>5</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille et Faculté de Médecine de Lille, Université de Lille, Lille, France

<sup>6</sup> Département de la recherche médicale, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, France

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

## Résumé :

*Blastocystis* est un protozoaire du groupe des straménopiles, colonisant le tube digestif de l'Homme et de nombreux animaux. Au sein de ce genre, 17 sous-types (STs) notés ST1 à ST17 ont été caractérisés à ce jour sur un plan moléculaire. La plupart ont une faible spécificité d'hôte, confirmant ainsi le potentiel zoonotique de ce parasite. De plus, neuf de ces STs ont été retrouvés chez l'Homme, avec des prévalences très variables. Dans de nombreuses études épidémiologiques, *Blastocystis* est le parasite le plus fréquent dans les selles humaines loin devant d'autres protozoaires tels que *Giardia*, *Entamoeba* ou *Cryptosporidium*. Comme pour les autres parasites entériques, la voie féco-orale est considérée comme le principal mode de transmission de *Blastocystis*, via la consommation d'eau ou d'aliments contaminées par des matières fécales. Une telle prévalence du parasite dans la population humaine de par le monde a levé de nombreuses interrogations sur son impact réel en santé publique. En effet, sa pathogénicité est longtemps restée incertaine du fait d'un portage asymptomatique très fréquent. Cependant, de multiples données récentes ont montré une association entre l'infection par *Blastocystis* et une variété de troubles digestifs aspécifiques, telles que des diarrhées ou des douleurs abdominales et ont permis d'identifier des molécules et mécanismes impliqués dans sa pathogénie. De plus, ce parasite serait susceptible de jouer un rôle majeur dans une pathologie intestinale chronique fréquente dans les pays industrialisés, le syndrome de l'intestin irritable, et dans l'apparition de lésions cutanées comme l'urticaire. Il serait, en outre, plus souvent retrouvé chez les patients immunodéprimés, devenant ainsi un parasite opportuniste de premier plan. Les études cherchant à déterminer une éventuelle corrélation entre ST et virulence des isolats restent encore trop contradictoires pour clarifier ce point. Depuis maintenant plus d'une dizaine d'années, un intérêt croissant s'est naturellement porté sur ce parasite, ce qui s'est traduit, entre autres, par la création récente de la *Blastocystis Research Foundation* aux Etats-Unis (<http://www.bhomcenter.org/>), l'ajout de *Blastocystis* sur la liste des parasites d'origine hydrique par l'Organisation Mondiale de la Santé et l'augmentation significative du nombre annuel de publications portant sur ce parasite négligé par les autorités sanitaires.

**Mots-clés :** *Blastocystis*, blastocystose, diversité génétique, épidémiologie moléculaire, pathogénicité, protozoose digestive, transmission, zoonose

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. – Introduction

Les protozooses intestinales représentent aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique pour les autorités sanitaires. Parmi les microorganismes impliqués, *Blastocystis* pourrait avoir une place de choix au regard de sa forte prévalence dans la population humaine (1-3). En effet, celle-ci peut atteindre 20% dans les pays industrialisés, incluant les pays européens (4), et largement dépasser les 50% dans les pays en développement (1,5). Ces valeurs soulignent l'impact socio-économique de cette infection, en particulier dans des régions où les conditions sanitaires restent précaires. Jusqu'à ces dernières années, le pouvoir pathogène de *Blastocystis* est resté controversé et l'absence de modèle animal approprié n'a pas permis de satisfaire le postulat de Koch pour confirmer le rôle étiologique de ce microorganisme dans les diarrhées. Cependant, un faisceau de données récentes issues d'enquêtes épidémiologiques, d'analyses génomiques, de cas cliniques et d'études *in vitro* et *in vivo* ont clairement mis en évidence une relation entre la colonisation par *Blastocystis* et l'apparition, en particulier, de troubles digestifs (1,2,6-10). De plus, toutes ces données ont permis d'identifier des facteurs de virulence potentiels et de proposer un schéma hypothétique des mécanismes impliqués dans la pathogénicité de ce parasite (1,6,8,11).

Compte tenu de l'intérêt croissant porté à *Blastocystis*, l'objectif de cette revue est de communiquer aux lecteurs les avancées récentes concernant ce microorganisme cosmopolite. Après une présentation succincte de son cycle biologique et de sa taxonomie, nous exposerons les méthodes permettant son identification, puis traiterons de sa prévalence et de sa circulation dans les populations humaines et animales, avant de développer ses modes de transmission. Nous résumerons ensuite les travaux se focalisant sur les molécules et mécanismes impliqués dans la physiopathologie de ce parasite, avant de détailler son impact en santé humaine et les traitements disponibles contre cette parasitose.

## II. – Polymorphisme, cycle biologique et culture de *Blastocystis*

L'une des caractéristiques majeures de ce protozoaire est son polymorphisme. En effet, pas moins de quatre formes majoritaires ont été décrites dans la littérature sur la base d'observations microscopiques de selles fraîches et de culture *in vitro*. Ces formes, qui rendent difficile l'assignation d'une forme spécifique au parasite, sont vacuolaire, granulaire, amiboïde et kystique (1,3,12) (**Figure 1**). Près de 90% du volume de la forme vacuolaire, dont la taille est généralement comprise entre 8 et 25  $\mu\text{m}$ , sont occupés par une vacuole centrale qui aurait un rôle de stockage et qui repousse en périphérie le cytoplasme et les organites



## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

cellulaires ; son identification est ainsi assez aisée. La forme granulaire, de plus petite taille, est pour sa part morphologiquement très proche de la forme vacuolaire si ce n'est la présence de granules très hétérogènes dans la vacuole centrale. Pour certains auteurs, elle serait même plutôt une forme vacuolaire au contenu cellulaire particulier plutôt qu'un stade parasitaire distinct (3). En général, les formes vacuolaires et, à un moindre degré, les formes granulaires sont prédominantes dans les échantillons de selles fraîches et en culture *in vitro* (**Figure 1**). La forme amiboïde, dont le diamètre varie de 3 à 8  $\mu\text{m}$  est, quant à elle, plus fréquemment observée dans les cultures *in vitro* que dans les selles fraîches, même si une excrétion prédominante de la forme amiboïde a été rapportée dans les selles de quelques patients symptomatiques (13). Enfin, la forme kystique, de petite taille (3 à 5  $\mu\text{m}$ ), est principalement constatée dans les échantillons de selles et rarement en culture *in vitro*.

A partir de toutes ces données, un cycle biologique hypothétique de *Blastocystis* a été proposé. L'ingestion de kystes, par consommation d'eau ou d'aliments contaminés, initierait l'infection de l'hôte humain ou animal (1,12,14). En effet, ils représentent la forme de résistance et de transmission du parasite. Ils peuvent survivre au moins 19 jours dans l'eau à température ambiante et résistent aux procédés les plus courants de désinfection de l'eau (1). Dans l'intestin de l'hôte, ces kystes se transformeraient en formes vacuolaires représentant les stades trophiques du parasite et qui pourraient s'y diviser. Certaines formes vacuolaires pourraient alors se transformer en formes granulaires ou amiboïdes, mais le rôle de ces deux dernières formes reste encore à clarifier. Puis, un certain nombre de ces formes vacuolaires s'enkysteraient lors de la traversée du côlon avant excrétion des formes vacuolaires et kystiques dans les selles et dissémination dans l'environnement. Les formes kystiques excrétées pourront à leur tour contaminer un nouvel ou le même hôte.

Différents milieux monophasiques ont été décrits pour cultiver en anaérobiose *Blastocystis*. L'*Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) supplémenté en sérum de cheval est aujourd'hui couramment utilisé dans différents laboratoires sous forme liquide ou solide par addition d'agar (15).

### III. – Taxonomie et diversité génétique de *Blastocystis*

#### A) Découverte de *Blastocystis* et émergence au sein des eucaryotes

*Blastocystis* a été décrit pour la première fois au début du XX<sup>ème</sup> siècle par Alexeieff, qui l'a alors considéré comme un nouveau genre de champignon du groupe des Ascomycètes (16). Il fut nommé *Blastocystis enterocola* avant que Brumpt ne remplace le nom d'espèce

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

*enterocola* par celui de *hominis* pour les organismes retrouvés dans les selles humaines (17). Ce n'est qu'en 1967 que *Blastocystis* sera classé parmi les protozoaires à partir de critères morphologiques et physiologiques tels que l'absence de croissance sur des milieux fongiques, une sensibilité à des molécules utilisées contre les protozoaires et une résistance aux fongicides (18). L'essor des approches moléculaires, permettant l'analyse et la comparaison des séquences de certains gènes utilisés comme marqueurs phylogénétiques, a par la suite permis de clarifier la taxonomie et les relations de parenté du genre *Blastocystis*. En 1996, une phylogénie reposant sur les séquences complètes du gène de l'ARN ribosomique (ARNr) 18S a révélé l'émergence de ce parasite au sein du groupe des straménopiles (19). Ce groupe complexe, appelé aussi hétérokontes, regroupe à la fois des organismes unicellulaires et pluricellulaires, hétérotrophes ou phototrophes, qu'ils soient libres comme les diatomées et les algues brunes ou parasites comme les oomycètes. Dans l'arbre phylogénétique présenté sur la **Figure 2**, *Blastocystis* émerge au sein des straménopiles hétérotrophes et est phylogénétiquement proche de *Proteromonas lacertae*, un endosymbionte flagellé de l'intestin de lézards et d'amphibiens. Ces deux microorganismes ont en commun la capacité de coloniser le tube digestif des vertébrés et de présenter un stade de résistance (kyste) qui est aussi le stade de transmission. A ce jour, *Blastocystis* est le seul straménopile connu pouvant infecter l'Homme, ce qui suggérerait un processus évolutif récent d'adaptation au parasitisme.

### **B) Classification du genre *Blastocystis***

Les isolats de *Blastocystis*, humains comme animaux, ne présentent que peu de différences morphologiques. Aussi, plusieurs espèces de *Blastocystis* telles que *B. hominis* chez l'Homme, *B. ratti* chez le rat, *B. anatis* chez le canard ou *B. pythoni* chez le python ont été décrites dans la littérature en fonction principalement de leur hôte d'origine, mais aussi de la température optimale de leur croissance et de leur profil caryotypique (1,3,12,20). Cependant, dès l'obtention de données de séquençage du gène de l'ARNr 18S de plusieurs isolats humains et animaux, une très large diversité génétique fut mise au jour au sein du genre *Blastocystis* par Noël *et al.* (21). Dans cette analyse englobant de nombreuses séquences d'isolats de mammifères et d'oiseaux, 9 sous-types (STs) ont été identifiés, chacun d'eux pouvant largement représenter une espèce au regard des distances évolutives observées entre STs. Certaines séquences d'isolats humains sont identiques à celles d'isolats animaux, confirmant ainsi le potentiel zoonotique de *Blastocystis* et sa faible spécificité d'hôte. Par ailleurs, plusieurs STs sont capables d'infecter l'Homme et, par conséquent, l'espèce *B.*

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

*hominis* précédemment décrite n'est plus taxonomiquement valable puisque non monophylétique (« espèce » non spécifique de l'Homme). Stensvold *et al.* ont proposé de nommer chaque isolat identifié par *Blastocystis* sp., suivi éventuellement du ST en cas de sous-typage (22). Depuis la publication de cette classification en 2007, plusieurs autres STs ont été identifiés chez différents hôtes, portant ainsi à 17 le nombre de STs individualisés (23) (**Figure 3**).

### IV. – Détection de *Blastocystis* dans les échantillons biologiques

#### A) Diagnostic microscopique

L'examen parasitologique des selles est le moyen diagnostique mis en oeuvre en routine dans les laboratoires hospitaliers du fait de son faible coût (**Figure 1**). Cependant, le polymorphisme de *Blastocystis* peut rendre l'identification du parasite difficile et limite la sensibilité de cette méthode : elle serait, selon une étude multicentrique que nous avons récemment réalisée en France (El Safadi *et al.*, soumis pour publication), de l'ordre de 45% si l'on prend comme référence les méthodes moléculaires. De plus, seul un technicien très expérimenté est capable de déceler le parasite par cette approche analytique. L'observation microscopique, « à l'état frais », de la selle diluée dans du sérum physiologique doit être réalisée au grossissement x 100 puis x 400. A ce dernier grossissement, la charge parasitaire peut-être estimée par comptage du nombre de *Blastocystis* par champ, contribuant ainsi à l'interprétation clinique de la présence du parasite. En effet, certains parasitologues établissent une corrélation entre la présence abondante de *Blastocystis* (plus de 5 par champ) et l'apparition de troubles digestifs si aucune autre étiologie n'est trouvée pour les expliquer (1). Les formes vacuolaires (et éventuellement granulaires) sont les plus fréquemment observées (**Figure 1**), tandis que les formes kystiques sont très difficilement identifiables du fait de leur petite taille et d'une confusion possible avec des débris fécaux. En outre, les différents STs de *Blastocystis* ne peuvent pas être distingués microscopiquement. Plusieurs types de colorations standards du frottis de selles peuvent permettre d'augmenter la sensibilité de l'examen microscopique (**Figure 1**). Par contre, les techniques de concentration des selles, la plus courante étant celle recourant au mélange formol-éther, sont moins contributives puisque les formes vacuolaires sont souvent altérées ou lysées par ces traitements (24). Enfin, comme pour toute recherche de parasites dans les selles, l'examen devra être réalisé sur trois échantillons prélevés sur une période de 7 à 10 jours car l'excrétion des parasites est généralement irrégulière.

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

## **B) Diagnostic par culture du parasite**

La culture xénique de selles en anaérobiose sur milieu de Jones pendant 24 à 72 heures a longtemps été considérée comme étant la référence (*gold standard*) pour diagnostiquer *Blastocystis*, compte tenu de sa plus grande sensibilité comparativement à la microscopie (24). Cependant, elle reste souvent réservée à des laboratoires spécialisés. De plus, dans les cas d'infections mixtes (présence d'au moins deux isolats de STs différents dans les selles d'un même patient), cette culture *in vitro* pourrait favoriser le développement d'un ST au détriment d'un autre et fausserait donc les résultats si cette culture est suivie d'un sous-typage des isolats (25). De plus, certains isolats ne poussent pas dans les conditions précédentes et il est difficile, voire impossible, d'appliquer cette approche à de larges cohortes de patients (1,25).

## **C) Recherche de copro-antigènes**

Un test rapide de détection des antigènes de *Blastocystis* dans les selles (Copro ELISA™ *Blastocystis*, Savyon Diagnostics, Israël) a récemment été développé ; sa sensibilité (92%) est assez proche de celle du diagnostic par culture et sa spécificité est de 87% (26). Son inconvénient majeur est de ne pas cibler tous les STs humains puisque le test met en jeu un mélange d'anticorps produits contre seulement les isolats ST1, ST2, ST3 et ST5 ; toutefois, ceux-ci représentent plus de 80% des isolats isolés jusqu'à présent chez l'Homme.

## **D) Diagnostic moléculaire**

La PCR est devenue aujourd'hui la méthode de référence pour la détection de *Blastocystis* à partir des selles de patients (27). En effet, plusieurs études ont montré la nette supériorité, en termes de sensibilité, de cette approche moléculaire comparée à la microscopie et à un moindre degré à la culture xénique (24,27). Plusieurs trousse de diagnostic *in vitro* estampillées CE-IVD ont été récemment mises sur le marché ou sont actuellement en développement. L'utilisation de ces trousse de PCR simplexe ou multiplexe (détectant simultanément plusieurs pathogènes dont *Blastocystis*) s'inscrira au sein d'un arbre décisionnel au laboratoire. L'étape d'extraction de l'ADN total à partir des selles est cruciale pour la réalisation de la PCR et plusieurs trousse commercialisées, dont les performances ont été comparées, sont disponibles (28). Du fait de la présence de formes kystiques de résistance dans l'échantillon, une étape de lyse mécanique des parasites à l'aide de billes (*bead beating*)

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

peut éventuellement améliorer l'efficacité de cette étape. Par ailleurs, la présence d'un contrôle interne d'amplification est indispensable compte tenu des nombreux inhibiteurs de PCR présents dans cette matrice biologique et potentiellement encore présents dans les échantillons après extraction.

La cible communément amplifiée est le gène codant l'ARNr 18S (2,27). Plusieurs domaines de longueur et de localisation variables peuvent être ciblés sur ce gène à l'aide d'amorces spécifiques du genre *Blastocystis*, permettant théoriquement d'amplifier la région correspondante à tous les STs du parasite (2). Une autre approche (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou RAPD) combine plusieurs couples d'amorces, dont chacun est spécifique d'un seul ST (amorces *Sequenced-Tagged-Site* ou STS), et analyse la présence ou l'absence d'un produit de PCR pour chacun des couples d'amorces mis en jeu (29). Les inconvénients de cette méthode sont : (a) sa pénibilité, puisque chaque échantillon doit être amplifié avec chaque couple d'amorces, (b) l'absence d'information concernant le ou les gènes ciblés et (c) l'utilisation actuelle de 7 couples d'amorces n'amplifiant donc que 7 des 17 STs connus (ST1 à ST7). L'intérêt est, par contre, de pouvoir identifier des infections mixtes par au moins deux STs différents chez un même individu. D'ailleurs, une approche similaire de PCR à l'aide d'amorces ciblant le gène de l'ARNr 18S a été développée mais ne permet, pour l'instant, que d'identifier simultanément 4 STs (30). Cette amplification de différents domaines du gène de l'ARNr 18S a d'abord été réalisée par PCR « en point final » puis par PCR « en temps réel », permettant un gain significatif en termes de sensibilité. C'est le cas de la PCR en temps réel, développée par Poirier *et al.* et reposant sur la chimie SYBR Green (31), fréquemment employée aujourd'hui lors d'études épidémiologiques (5), et de celle de Stensvold *et al.* qui propose la chimie Taqman (32).

### **E) Sous-typage des isolats**

Le sous-typage des isolats de *Blastocystis* ne présente, dans l'état actuel des connaissances, qu'un intérêt épidémiologique puisque la relation entre le ST et la pathogénicité du protozoaire n'a pas encore été clairement établie. Il est réalisé par séquençage des produits d'amplification résultant d'une PCR en point final ou d'une PCR en temps réel. Les séquences nucléotidiques ainsi obtenues sont ensuite comparées à celles déjà disponibles dans les bases de données pour les domaines homologues d'isolats de STs connus. Ainsi, en règle générale, l'assignation d'un isolat à un ST donné repose sur une identité de séquence du domaine comparé égalant ou dépassant les 96%. Une valeur inférieure à ce

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

pourcentage peut évoquer un nouveau ST qui devra être ultérieurement vérifié par l'identification d'isolats supplémentaires appartenant à ce nouveau ST et par une analyse phylogénétique. Il est d'ailleurs fortement conseillé de séquencer le gène complet de l'ARNr 18S du ou des isolats pouvant être représentatif(s) d'un nouveau ST afin d'optimiser l'analyse phylogénétique correspondante.

### V. – Prévalence de *Blastocystis* dans la population humaine

Les nombreuses enquêtes épidémiologiques menées à ce jour à travers le monde montrent que *Blastocystis* a une répartition cosmopolite. De plus, dans plusieurs pays pour lesquels des études comparatives sont disponibles, il est le protozoaire le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines loin devant d'autres parasites unicellulaires à transmission hydrique comme *Giardia*, *Entamoeba* et *Cryptosporidium* (33). La recherche du parasite dans ces enquêtes a été réalisée selon les différentes méthodes décrites précédemment. Or, les méthodes « non-moléculaires » d'identification sont moins sensibles que les méthodes moléculaires (27,31), induisant probablement une sous-estimation de la prévalence du parasite dans les études reposant en particulier sur l'observation microscopique directe des selles qui reste encore de loin la plus utilisée.

Globalement, la prévalence de *Blastocystis* serait faible dans les pays développés du fait de l'absence de péril fécal (1,3) et en particulier dans certains pays asiatiques comme le Japon (0,5% à 1%) et Singapour (3,3%). C'est aussi le cas, dans une moindre mesure, dans des pays européens (**Tableau**) comme l'Italie (7,1%) (33), l'Espagne (7%) (34) et le Royaume-Uni (6,9%) (35). En France, les deux premières études publiées ont rapporté des prévalences respectivement de 3% et 6% (36,37). Cependant, toutes ces données avaient été établies à partir d'une recherche du parasite par observation microscopique directe des selles. Ainsi en France, en employant plus récemment la PCR en temps réel comme méthode d'identification, la prévalence de *Blastocystis* s'élevait à 14,5% dans une étude mono-centrique incluant 186 patients (31) et à 18,3% dans une étude multicentrique englobant 788 patients (El Safadi *et al.*, soumis pour publication). Ces dernières valeurs de prévalence étaient du même ordre de grandeur que celles rapportées, par des approches moléculaires identiques, dans des pays voisins comme les Pays-Bas (24,2%) (4) et le Danemark (23%) (24). La prévalence moyenne du parasite avoisinerait donc 20% de la population européenne.

Dans les pays en développement, la prévalence de *Blastocystis* est généralement plus élevée (1,3) par suite de la consommation d'eau ou d'aliments plus aisément contaminés, d'un contact

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

plus étroit avec des animaux qui constituent des sources potentielles de contamination, et de conditions d'hygiène plus précaires. Ainsi, la prévalence de *Blastocystis* peut dépasser 40% comme au Brésil (40,9%), au Nigeria (49%), en Indonésie (60%) ou au Libéria (70%) en utilisant, selon les études, des méthodes d'identification morphologique ou moléculaire (1,38). Elle atteint même, par PCR en temps réel, 100% dans une cohorte d'enfants sénégalais (5).

Des variations considérables de la prévalence de *Blastocystis* ont été observées entre des études menées dans un même pays, comme par exemple en Malaisie (3,9% à 52,3%), en Chine (1,9 % à 32,6%) ou en Thaïlande (0,19% à 45,2%) (1). Si la même méthode d'identification a été utilisée, ces fluctuations peuvent alors refléter de réelles distinctions entre régions géographiques pour lesquelles le climat, les habitudes alimentaires ou le tissu socio-économique ou industriel, peuvent être très différents. Cependant, l'approche choisie pour l'identification du parasite couplée à l'expertise de l'investigateur est très probablement fortement liée à ces variations : pour preuve, dans l'étude multicentrique réalisée récemment en France, seulement 45,8% des échantillons positifs par PCR en temps réel l'étaient par observation microscopique des selles (El Safadi *et al.*, soumis pour publication). Un autre facteur important pouvant expliquer ces oscillations est la composition des cohortes étudiées selon qu'elles comprennent majoritairement des adultes ou des enfants, des migrants, des voyageurs ou des sédentaires, des individus symptomatiques ou asymptomatiques ou des sujets immunocompétents ou immunodéprimés. Par exemple, en Italie, la moyenne de prévalence du parasite dans une cohorte de patients était de 7,1% (33) ; toutefois, une différence significative était constatée entre le niveau d'infection des personnes de nationalité italienne (6,1%) et celles nées en Afrique, en Asie, en Amérique du Sud ou en Amérique centrale et vivant depuis peu en Italie (14,1%). Ces données furent confirmées la même année par Gualdieri *et al.*, lors d'une étude menée à Naples et mentionnant une prévalence de *Blastocystis* de 52,7% chez des migrants originaires essentiellement d'Afrique et d'Asie (39). Ce sont du reste les deux continents pour lesquels les facteurs de risque d'infection à *Blastocystis* semblent les plus importants si on se réfère à une autre étude conduite en Allemagne et dans laquelle près de 40% des voyageurs étaient contaminés à leur retour de ces régions du globe (40). Un autre exemple concerne les Pays-Bas, puisque les patients du département de médecine tropicale ayant récemment voyagé étaient presque 3 fois plus infectés par le parasite que ceux des autres départements de l'hôpital (4).

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau - Prévalence de *Blastocystis* dans la population européenne.**

Pays	Région/Ville	Type de sujets	Nombre total de sujets	Méthode de détection	Prévalence	Réf.
Italie	Rome	Italiens et étrangers vivant en Italie mais nés en Afrique, Asie, Amérique du Sud ou Amérique Centrale	5351 (4695 Italiens et 656 Etrangers)	Observation microscopique	Globale : 7,1% Patients Italiens : 6,1% Patients étrangers : 14,1%	33
Italie	Naples	Immigrés originaires majoritairement d'Afrique et d'Asie	514		52,7%	39
Espagne	Catalogne	Patients présentant des troubles digestifs	8313		7%	34
Pays de Galles	Aberystwyth	Population générale présentant ou non des troubles digestifs	1390		6,9%	35
Allemagne	Munich	Voyageurs revenant de pays tropicaux	5378		39,8%	40
France	Grenoble	Population générale présentant ou non des troubles digestifs	2581		3,0%	36
France	Paris	Population générale présentant ou non des troubles digestifs	9700		6,1%	37
France	Clermont-Ferrand	Patients hospitalisés pour un cancer du sang et patients contrôle immunocompétents présentant ou non des troubles digestifs	186 (94 patients avec cancer et 92 contrôles)	PCR en temps réel	Globale : 14,5% Patients avec cancer : 16,0% Patients contrôle : 13,0%	31
France	Etude multicentrique impliquant 11 laboratoires répartis sur tout le territoire	Population générale présentant ou non des troubles digestifs	788		18,3%	El Safadi, Cian <i>et al.</i> soumis
Pays-Bas	Amsterdam	Patients du département des maladies tropicales (voyageurs) et patients des autres départements	442 (133 voyageurs et 309 autres)	PCR standard	Globale : 24,2% Département des maladies tropicales : 38,0% Autres départements : 18,0%	4
Danemark	Copenhague	Patients présentant des troubles digestifs	93		23,0%	24



## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

### VI. – Distribution des STs de *Blastocystis* dans la population humaine

A ce jour, 17 STs ont été isolés parmi les isolats de mammifères et d'oiseaux (23) et 9 de ces STs ont été trouvés chez l'Homme (2,38). Récemment, Alfellani *et al.* ont compilé l'ensemble des données, disponibles dans la littérature, concernant les isolats humains typés (38). Ainsi, parmi les 3171 isolats pris en compte dans cette synthèse, les ST1 (27,8%), ST2 (10,8%), ST3 (44,2%) et ST4 (10,0%) représentaient à eux quatre plus de 90% du contingent. Même si ces 4 STs peuvent aussi être isolés d'animaux, leur prédominance dans la population humaine peut très probablement s'expliquer par une large transmission interhumaine. Les ST5 (0,3%), ST6 (2,8%), ST7 (3,7%) et ST8 (0,3%) sont minoritaires et sont considérés comme des STs d'origine animale. Aussi, leur présence dans la population humaine serait probablement le résultat d'une transmission zoonotique. Enfin, le ST9 n'a pour l'instant été dépisté que chez l'Homme et seuls trois cas d'infection (0,1% des isolats sous-typés) ont été répertoriés à ce jour, au Danemark et au Japon (2,38). Dans une énorme majorité de pays à travers le monde, le ST3 est prédominant suivi des ST1, ST2 et ST4, dans un ordre variable pour ces 3 derniers STs. Cependant, certaines études ont montré que le ST4 était majoritaire dans la région de Valence en Espagne et que le ST1 l'était, par exemple, dans la province de Chonburi en Thaïlande. Il faut cependant rester très prudent sur ces dernières observations pour deux raisons. La première est que l'une des amorces oligonucléotidiques, mises en jeu dans la PCR de détection du parasite avant sous-typage, pourrait préférentiellement amplifier certains STs. La seconde est que la distribution des STs a été établie pour une contrée donnée et qu'elle ne reflète pas obligatoirement la situation au sein du pays. En France par exemple, des variations nettes dans les distributions des STs ont été mises au jour entre différentes régions, même si on observe une prédominance globale du ST3 au niveau national (El Safadi *et al.*, soumis pour publication).

Entre continents, des variations significatives de distribution des STs ont aussi été notées. Le ST4 est par exemple très fréquent en Europe, alors qu'il est rare voire absent sur les autres continents (2,38), suggérant une émergence récente de ce ST dans la population européenne (2). Les ST6 et ST7 sont, quant à eux, plus communs en Afrique et en Asie qu'en Europe (2,38). Ces différences peuvent résulter par la présence ou l'absence de certaines sources de contamination, puisque ces deux STs sont considérés comme des STs aviaires (23).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

### VII. – Prévalence et distribution des STs dans la population animale et potentiel zoonotique de *Blastocystis*

De nombreuses études réalisées dans différents pays ont recherché *Blastocystis* chez divers groupes d'animaux, qu'ils soient sauvages ou en captivité. Ainsi *Blastocystis* a été décelé, par des méthodes morphologiques ou moléculaires, chez de nombreux mammifères comme les primates non humains, les artiodactyles (bovins et porcins), les proboscidiens (éléphants), les perissodactyles (équidés, entre autres), les carnivores et les chiroptères mais aussi chez les oiseaux, les marsupiaux, les rongeurs, les squamates (lézards et serpents), les testudines (tortues), les poissons, les amphibiens, les mollusques et les insectes (blattes) (12,20,23).

Au cours des 5 dernières années, de larges enquêtes épidémiologiques ont été conduites principalement dans des zoos, des parcs naturels ou des élevages afin de clarifier la distribution des différents STs de *Blastocystis*, en particulier chez les mammifères et les oiseaux. Dans une revue récente, Alfellani *et al.* ont compilé les données de sous-typage disponibles à travers le monde pour ces groupes d'animaux (23). Même si le nombre d'études et d'isolats analysés est très variable d'un groupe d'animaux à l'autre, ces données montrent la forte prévalence du parasite chez les singes avec une prédominance des ST1, ST2 et ST3. De manière intéressante, ce sont aussi les trois STs majoritaires dans la population humaine et cette concordance pourrait être liée à la parenté évolutive du singe et de l'Homme. La prévalence du parasite est aussi importante chez les artiodactyles pour lesquels les ST1 et ST5 sont largement prédominants, avec cependant des variations selon que l'on analyse les porcins ou les bovins. En effet, chez les porcins, les ST5 et ST1 sont équitablement répartis et représentent l'énorme majorité des isolats. Par contre, chez les bovins, la distribution des STs est beaucoup plus hétérogène, avec pas moins de 7 STs représentés, principalement ST1 et ST10, ce dernier n'ayant encore jamais été identifié chez l'Homme. Pour les autres groupes d'animaux, le faible nombre d'isolats rend difficile l'établissement de tendances dans les prédominances de certains STs.

Au regard du caractère ubiquiste de *Blastocystis* dans le monde animal, la question du potentiel zoonotique de ce parasite s'est naturellement très vite posée. L'identité de séquence du gène de l'ARNr 18S observée pour des isolats venant d'hôtes très variés a rapidement confirmé cette hypothèse et, par conséquent, la faible spécificité d'hôte de plusieurs STs (21). Ainsi, l'Homme et certains groupes d'animaux peuvent être infectés par les mêmes STs. Plusieurs études ont clairement mis en évidence cette transmission zoonotique, comme celle

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

de Parkar *et al.* démontrant une prévalence nettement plus importante du parasite chez les gardiens de zoos (63%) par rapport à celle observée dans la population contrôle n'ayant pas de contact avec des animaux (9%) (41). Ces personnels étaient, en outre, infectés par les mêmes STs que ceux identifiés chez les animaux en captivité. De même, des enfants népalais étaient parasités par les mêmes isolats ST2 que ceux présents chez des singes vivant à proximité de leurs habitations, dans une région où l'eau et les aliments pouvant être facilement contaminés par les excréments de ces animaux (42). Par ailleurs, des singes d'un zoo danois étaient infectés par des isolats de ST8 (43), extrêmement rare chez l'Homme (23), et pourtant, près de 25% des gardiens de ce zoo étaient contaminés par ce même ST. Enfin, une étude récente a montré la forte prévalence de *Blastocystis* dans un élevage de porcins en Australie (76,7%) (44). Dans cette enquête, une énorme majorité de ces animaux était infectée par le ST5, un ST là encore peu fréquemment isolé chez l'Homme (23). Pourtant, environ 83% du personnel de cet élevage étaient infectés par le parasite, un taux extrêmement élevé pour un pays industrialisé, et près de 14% de celui-ci étaient contaminés par du ST5, identique aux porcins. Il est donc clair que plusieurs groupes d'animaux représentent des sources potentielles de contamination humaine. L'impact de cette transmission zoonotique reste encore probablement sous-estimé, car elle est souvent difficile à évaluer lorsqu'elle concerne, en particulier, la circulation des ST1 à ST4 très communs chez l'Homme.

### **VIII. – Modes de transmission de *Blastocystis***

En plus d'une transmission zoonotique possible du parasite, la grande prépondérance des ST1 à ST4 dans la population humaine suggère une forte transmission anthroponotique. Elle pourrait être soit directe, par contact avec des patients infectés, mais ce mode de contamination reste à confirmer, soit indirecte par ingestion d'eau ou de nourriture contaminées par des selles humaines. Cependant, très peu d'études ont clairement mis en évidence une transmission interhumaine de *Blastocystis*. On peut toutefois citer les travaux de Yoshikawa *et al.*, qui ont identifié les STs partagés par 32 patients et surveillants de deux établissements de santé (45), et ceux de Thathaisong *et al.*, qui ont montré que le taux de prévalence du ST1 atteignait 95% dans une résidence de jeunes filles de Bangkok (46). Ces deux études ont évoqué une transmission interhumaine reliée à une forte promiscuité. En dehors de ces contacts « directs », les supports de transmission sont l'eau et les aliments souillés par les kystes du parasite. Pour ce qui est de la mise en évidence d'une transmission d'origine hydrique du parasite, et même s'il est plus que probable que l'eau soit le principal

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

vecteur de circulation de celui-ci, peu de données sont finalement disponibles dans la littérature, car ce parasite n'est généralement pas recherché dans le cadre d'épisodes épidémiques. Ainsi, une seule épidémie potentielle à grande échelle a été recensée dans la province de Jiangxi en Chine, avec 1122 cas de diarrhée sur une période d'une semaine (47). Dans cet épisode, une eau de consommation contaminée par *Blastocystis* serait la source probable de l'infection, même si cette cause n'a pas été confirmée. En parallèle, le parasite a été recherché par des outils moléculaires et identifié dans des rivières, des eaux récréatives ou de l'eau de consommation (48). Il est intéressant de noter que les STs identifiés dans ces sources d'eau étaient généralement identiques à ceux isolés de populations humaines et éventuellement animales. De plus, Suresh *et al.* ont analysé des eaux usées, avant et après traitement, au Royaume-Uni et en Malaisie et montré qu'en moyenne, 50% des affluents et 28% des effluents testés contenaient des kystes viables, c'est-à-dire cultivables, de *Blastocystis* (14). Ces données sont quelque peu inquiétantes, puisqu'elles démontrent l'inefficacité des traitements conventionnels par chloration ou ozonation des eaux usées qui ne détruisent pas les kystes du parasite, facilitant ainsi sa dissémination et sa transmission (1). Enfin, la dernière source de transmission peut être la nourriture mais, à ce jour aucune étude n'a été publiée concernant l'identification du parasite directement dans les aliments. Cependant, plusieurs enquêtes, dont celle de Cruz Licea *et al.*, ont révélé une prévalence importante du parasite chez les vendeurs ou manipulateurs de viande (49).

### **IX. – Molécules et mécanismes impliqués dans la pathogénicité de *Blastocystis***

#### **A) Génomes et prédiction de protéines impliquées dans l'interaction hôte parasite**

Les génomes de différents STs de *Blastocystis* (ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7, ST8 et ST9) ont été séquencés (voir [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome)), mais à ce jour deux seulement, ST4 et ST7, ont été annotés (50, 51). Leur taille varie de 11.5 Mb (ST4) à 18,8 Mb (ST7), et 6020 gènes ont été prédits dans le génome du ST7 contre 5707 dans celui du ST4. Si on compare ces données à celles obtenues pour d'autres straménopiles parasites ou non, la taille du génome de *Blastocystis* est réduite puisque, à titre d'exemple, celles de *Phytophthora infestans* (un parasite de plante) et de *Saprolegnia parasitica* (un parasite de poisson) sont estimées respectivement de 240 et 63 Mb. De même, le nombre de gènes de *Blastocystis* est fortement restreint par rapport à *P. infestans* (17797 gènes) et *S. parasitica* (17065 gènes). Cela suggère un processus évolutif récent d'adaptation de *Blastocystis* au parasitisme qui a pu s'accompagner, comme pour d'autres parasites, d'une réduction génomique.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

L'analyse *in silico* des deux génomes annotés de *Blastocystis* a permis d'identifier plusieurs protéines pouvant potentiellement jouer un rôle dans la virulence du parasite (1,6,9,11,51,52). Parmi celles prédites comme sécrétées figurent une vingtaine de protéases à cystéine. Ces protéases sont connues chez d'autres parasites pour jouer un rôle majeur dans l'invasion des cellules, l'évasion du système immunitaire et la régulation du cycle cellulaire de l'hôte. Dans la blastocystose, elles pourraient être impliquées dans une détérioration de la barrière mucoale de l'hôte en dégradant les jonctions serrées de l'épithélium intestinal, entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Des protéines apparentées à des inhibiteurs de protéases ont également été mises en évidence et pourraient perturber l'homéostasie intestinale. L'inhibiteur de protéase de type 1 inhiberait des enzymes de l'hôte, telle que la chymotrypsine, et permettrait au parasite de se protéger de l'environnement stomacal. Des hydrolases pourraient aussi dégrader le mucus intestinal afin de fournir les nutriments nécessaires au développement du parasite. L'annotation des génomes a également révélé des gènes codant des protéines connues pour être constitutives de canaux ou pompes membranaires (Transporteurs *ATP-Binding* Cassette ou ABC) contribuant à la multi-résistance aux drogues (MDR) et qui ont déjà été identifiées chez certains protozoaires pathogènes comme *Leishmania*, *Trypanosoma* et *Plasmodium*. Ces canaux pourraient être ainsi liés à la résistance au métronidazole constatée chez certains STs de *Blastocystis*. D'autres gènes codant une polyketide synthase (PKS) et des peptides non ribosomiaux (NRPS) ont été identifiés : ils interviennent dans la synthèse de métabolites secondaires, dont certains ont une activité antimicrobienne. De ce fait, le parasite pourrait modifier le microbiote intestinal de l'hôte. Enfin, d'autres gènes d'origine bactérienne codent des protéines de types immunophilines et cadhérines pouvant permettre l'adhésion du parasite à l'épithélium intestinal.

### **B) Physiopathologie de la parasitose**

Plusieurs études, pour la plupart réalisées *in vitro* par absence d'un modèle animal reproductible de blastocystose, ont été menées afin d'analyser l'effet du parasite sur des cellules épithéliales intestinales humaines ou de rongeurs et donc d'identifier les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'infection (1,6,11,52) (**Figure 4**). L'un des premiers effets observés a été la capacité du parasite à induire l'apoptose des cellules épithéliales intestinales de l'hôte (53). Ce mécanisme, indépendant du contact parasitaire, met en jeu l'activation de la voie des caspases 3 et 9 de la cellule hôte (54). Plus récemment, Wu *et al.* ont montré que l'adhésion à l'épithélium intestinal de l'hôte représentait une étape cruciale

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

(10), dont l'efficacité dépend des STs. De plus, l'attachement du parasite est inhibé par l'addition de galactose, suggérant qu'il adhère à ce type de résidus à la surface de l'épithélium intestinal (10). Cette adhésion a lieu préférentiellement au niveau des jonctions serrées et induit un total réarrangement des protéines les constituant, telles que l'occludine et la protéine ZO1 (10). L'apoptose des cellules de l'hôte et la réorganisation des jonctions serrées seraient induites par les protéases à cystéine sécrétées par le parasite. Ces enzymes sont aussi capables d'induire une réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule hôte, via la phosphorylation des chaînes légères de myosine par des kinases de la famille Rho (8). L'action de ces protéases couplée à l'adhésion du parasite entraîne ainsi une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale.

Le parasite possède aussi des propriétés immunomodulatrices le rendant capable de se protéger du système immunitaire de l'hôte, en particulier lors de son implantation. Ainsi les protéases à cystéine peuvent dégrader les immunoglobulines (Ig) A, prédominantes à la surface de l'épithélium intestinal et essentielles pour éviter toute adhésion et colonisation par des microorganismes (55). Ces mêmes protéases sont aussi capables d'induire la production d'interleukine (IL)-8 pro-inflammatoire et de *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) par la cellule hôte via l'activation du *Nuclear Factor* (NF) -  $\kappa$ B (56). L'expression d'autres gènes codant des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-12 et l'interféron- $\gamma$  est aussi augmentée dans la muqueuse caecale de rats infectés par *Blastocystis* (57). C'est aussi le cas de ceux codant pour l'IL-1, l'IL-6 et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dans des explants intestinaux et des côlons de souris mis en contact avec les antigènes du parasite (58). Cette surexpression de cytokines pro-inflammatoires permettrait la survie et la dissémination du parasite en causant un afflux de cellules inflammatoires dans la muqueuse intestinale, ce qui contribuerait à la symptomatologie de la blastocystose. D'ailleurs, Moe *et al.* ont montré que l'infection orale de souris par *Blastocystis* déclenchait une intense infiltration du côlon par des cellules pro-inflammatoires (59). Enfin, un autre mécanisme de survie développé par le parasite concerne sa résistance au stress nitrosatif. En effet, *Blastocystis* est sensible à l'oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote NO) produit par l'oxyde nitrique synthase (NOS) des entérocytes et macrophages qui catalyse la conversion d'arginine en NO et dont l'expression est activée par les cytokines (60). Cependant, le parasite est capable de réduire l'expression de la NOS entérocytaire en limitant la disponibilité en arginine et donc en substrat de cette enzyme de l'hôte, induisant ainsi une chute de la production de NO.

### **X. – Impact de *Blastocystis* en santé humaine**

Le pouvoir pathogène de *Blastocystis* est longtemps resté incertain, du fait essentiellement de sa forte prévalence chez des individus asymptomatiques. Cependant, *Blastocystis* est aussi le seul parasite identifié chez de nombreux patients présentant, entre autres, des troubles intestinaux. Chez les patients symptomatiques, les troubles digestifs associés ne montrent aucun caractère particulier, puisqu'il s'agit le plus souvent de diarrhées, de douleurs abdominales, de vomissements, de ballonnements, de flatulences et de nausées. L'interprétation des données épidémiologiques issues de la littérature et relative à la pathogénicité du parasite reste toujours sujette à caution du fait de plusieurs biais possibles. En effet, dans la plupart des études rapportées, aucune recherche d'autres entéropathogènes bactériens et viraux n'était réalisée et les groupes témoins faisaient le plus souvent défaut. De plus, les outils de diagnostic utilisés dans certaines enquêtes étaient peu sensibles et les études concernaient très souvent des cohortes englobant un nombre restreint d'individus.

#### **A) Blastocystose et troubles digestifs**

Les troubles digestifs les plus fréquemment observés dans les cas de blastocystose sont les diarrhées et les douleurs abdominales (1,3). Ces symptômes peuvent être d'une intensité variable, allant d'une maladie diarrhéique légère jusqu'à une diarrhée chronique ou une gastroentérite aiguë. Plusieurs auteurs ont aussi dépisté le parasite dans des cas de colite, de colite hémorragique ou ulcéreuse et d'iléite (3). Dans tous ces cas, une résolution des symptômes est généralement notée après traitement des patients par le métronidazole. Le parasite infecte préférentiellement le cæcum et le côlon de l'hôte, mais a pu être aussi localisé, occasionnellement, dans d'autres parties du tube digestif ainsi que dans le liquide péritonéal. *In vivo*, les observations par endoscopie et biopsie n'ont, globalement, pas montré clairement d'invasion de la muqueuse du côlon humain par *Blastocystis*, même si des œdèmes et inflammations de la muqueuse intestinale étaient visibles (1). D'ailleurs, Janarthanan *et al.* (61) ont indiqué que l'infection causée par *Blastocystis* pouvait être associée à une diarrhée et une inflammation aiguë de la muqueuse du côlon, ainsi qu'à des ulcères du cæcum et du rectum. Plusieurs autres études récentes ont fait état d'une invasion tissulaire de l'appendice ou de la muqueuse ou sous-muqueuse colique par le parasite avec une inflammation chronique (62). De plus, l'identification de *Blastocystis* dans des prélèvements d'appendice chez des patients atteints d'appendicite aiguë suggère une association entre ce parasite et l'inflammation (62).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le syndrome de l'intestin irritable est une colopathie chronique fonctionnelle très courante, en particulier dans les pays industrialisés, dont le retentissement sur la qualité de vie des malades est majeur. Or, dans ce type de pathologie, le rôle probablement significatif de protozoaires intestinaux comme *Blastocystis* reste très discuté (63). En effet, plusieurs études épidémiologiques ont rapporté une plus forte prévalence du parasite chez les patients présentant ce syndrome par rapport à celle observée chez les patients sains ou souffrant d'autres troubles intestinaux (1-3,6,7,9,11,52,64). Cependant, cette corrélation n'est pas clairement démontrée dans certaines autres enquêtes. Il est vrai que dans ce genre d'études épidémiologiques et en raison de la complexité d'une telle pathologie, il est très difficile de pouvoir déterminer un groupe contrôle et donc de proposer un lien causal entre la prévalence du parasite et cette colopathie. D'autre part, la plupart des symptômes attribués à une infection par *Blastocystis* sont similaires à ceux observés dans les cas de ce syndrome de l'intestin irritable qui pourrait s'expliquer par des mécanismes physiopathologiques communs comme l'ont suggéré Poirier *et al.* (11). Trois hypothèses peuvent rendre compte de cette association. La première est que le parasite pourrait être directement responsable de la symptomatologie observée. En effet, on sait qu'une partie des patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable déclare la maladie après un épisode infectieux. Une inflammation via une exposition persistante d'antigènes de *Blastocystis* lors d'une infection chronique pourrait être un mécanisme possible (63). Dans la deuxième hypothèse, le parasite serait indirectement responsable de la symptomatologie en induisant une modification du microbiote intestinal, qui est maintenant connue chez les patients atteints de ladite maladie. D'ailleurs, il a été récemment montré que l'infection par *Blastocystis* était associée à une diminution de bactéries protectrices du microbiote intestinal (*Bifidobacterium*) chez des patients masculins atteints du syndrome de l'intestin irritable (65). Enfin, la troisième hypothèse serait que les modifications du transit intestinal et de la microflore digestive chez ces patients favoriseraient l'implantation du parasite, qui ne serait alors qu'un « marqueur » de ces troubles.

### **B) Blastocystose et immunodépression**

*Blastocystis* est de plus en plus impliqué dans les maladies diarrhéiques dont souffrent les individus immunodéprimés, en faisant ainsi un probable parasite opportuniste (1,3,6,9,52). Des taux de prévalences élevés du parasite ont été récemment observés chez des patients immunodéprimés par le virus de l'immunodéficience humaine (66-68). Par exemple, la prévalence de *Blastocystis* atteint 72,4% chez des indonésiens infectés par le virus (66) et en



## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ethiopie, Alemu *et al.* (67) ont même montré que le protozoaire était détecté chez 10,5% des malades, mais absent dans la population contrôle épargnée par le virus. Dans toutes ces cohortes, *Blastocystis* est souvent le parasite eucaryote unicellulaire le plus fréquent. Dans ces mêmes populations, une corrélation entre le taux de prévalence de *Blastocystis* et celui des lymphocytes T CD4 < 200/mm<sup>3</sup> a été établie (66,68). La prévalence de *Blastocystis* peut aussi être élevée chez des patients immunodéprimés atteints de cancer colorectaux et d'hémopathies, chez des transplantés rénaux et chez des malades dialysés (1,6).

### C) Blastocystose et urticaire

De nombreux cas d'urticaire associé à la présence de *Blastocystis* et régressant généralement après éradication du parasite, ont été rapportés, ainsi qu'une prévalence plus importante du parasite dans des cohortes d'individus atteints de cette pathologie (1,6,52,64,69). A ce jour, les mécanismes physiopathologiques permettant d'expliquer la relation entre la présence de ce protozoaire entérique et l'apparition de manifestations cutanées restent méconnus. Plusieurs hypothèses ont été émises (69), dont celle de l'induction de l'activation des lymphocytes de la voie Th2 par les antigènes parasitaires et la production de cytokines pro-inflammatoires, aboutissant à la production d'IgE similaire à une réponse allergique.

### D) Corrélation entre STs de *Blastocystis* et pathogénicité

La corrélation éventuelle entre ST de *Blastocystis* et pouvoir pathogène du parasite est depuis plusieurs années une hypothèse de travail majeure. Aussi, un grand nombre d'études épidémiologiques ont cherché à mettre en évidence cette correspondance en analysant des cohortes de patients infectés par le parasite et présentant différentes pathologies (troubles digestifs, urticaires...), mais les résultats obtenus restent finalement très contradictoires (1,2,6,7,52,64). D'après toutes ces données épidémiologiques, il n'existerait à l'heure actuelle aucun consensus quant à la prédominance de certains STs plutôt que d'autres dans le développement de symptômes gastro-intestinaux ou d'une pathologie digestive précise. En attendant d'avoir plus d'informations concernant la signification physiopathologique de la diversité génétique du genre *Blastocystis*, on s'orienterait donc plutôt vers la coexistence de souches pathogènes et non pathogènes au sein d'un même ST, pour au moins les 4 principaux isolés de l'Homme (ST1 à ST4). Des différences significatives entre les ST4 et ST7 ont été décrites ci-dessus en termes d'adhésion, puis de réorganisation des jonctions serrées de

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

l'épithélium intestinal de l'hôte (10). Cependant, très peu d'isolats de ces deux STs ont été testés et il est donc difficile de pouvoir généraliser les résultats obtenus à des STs entiers.

### **XI. – Traitement de la blastocystose**

Le besoin de traiter des individus infectés par *Blastocystis* est longtemps resté équivoque du fait du pouvoir pathogène controversé de ce parasite (1,6,9,70). En général, un traitement contre la blastocystose est envisagé si le patient présente une diarrhée persistante et si aucun pathogène hormis *Blastocystis*, n'est découvert dans les selles du patient. A l'heure actuelle, aucun traitement n'est pleinement efficace contre la blastocystose et plusieurs molécules ont été proposées (9,70). Le métronidazole (Flagyl®) est utilisé en première intention (1,5 g/j en 3 prises pendant 10 jours chez l'adulte). Cependant, de nombreux échecs thérapeutiques ont été décrits, liés à la possibilité d'isolats résistants à la molécule et/ou à une sensibilité variable selon le ST. Quoiqu'il en soit, plusieurs autres agents antimicrobiens ont été envisagés, le plus souvent en seconde ligne ou en complément du métronidazole et, certains se sont avérés efficaces contre le parasite. Parmi eux, le plus commun est sans doute l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) (Bactrim® ; TMP 160 mg- SMX 800 mg, à raison de 2 comprimés/jour pendant 7 à 10 jours chez l'adulte) ; elle peut-être combinée ou non au Secnidazole (Secnol® : 1,2 g par jour), un autre imidazolé qui est indiqué en cas d'absence de réponse ou d'intolérance au métronidazole. Le mécanisme d'action de tels traitements sur *Blastocystis* reste à définir. D'autres molécules ont été testées (furazolidone, nitazoxanide, iodoquinol, tinidazole, paromomycine...) avec des réponses variables suivant leur administration, et des études complémentaires doivent être menées pour s'assurer de leur efficacité. Un examen parasitologique des selles devra être réalisé 3 à 4 semaines après l'arrêt du traitement, afin de s'assurer de son efficacité. En cas d'échec, il conviendra également d'envisager une éventuelle source de (re)contamination.

### **XII. – Conclusion**

La prévalence de *Blastocystis* s'avère très importante dans les pays en développement, en raison des conditions d'hygiène très précaires (péril fécal) facilitant la transmission du parasite, en particulier par voie hydrique. Cependant, les prévalences observées dans les pays industrialisés, qui ne sont pourtant pas des zones classiques d'endémie, sont en constante augmentation en relation probablement avec les séjours des populations de ces pays dans des régions du globe à haut risque d'infection et une immigration intense. Malgré les dernières

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

données concernant la physiopathologie de *Blastocystis*, une partie de la communauté médicale considère toujours ce parasite comme un commensal dont la prise en compte n'est pas nécessaire. Pourtant, nombreux sont les cliniciens qui se sont trouvés face à des patients présentant des troubles digestifs sans autre entéropathogène que *Blastocystis* et qui ont instauré un traitement antiparasitaire, puis observé la disparition des symptômes concomitamment à celle du parasite. La simple et souvent seule argumentation de la forte fréquence de portage asymptomatique du parasite dans la population ne peut plus être retenue au regard des avancées significatives concernant la pathogénicité de *Blastocystis*. Aussi, sa recherche systématique lors d'un examen parasitologique des selles et sa prise en compte dans la prise en charge des patients présentant des symptômes compatibles avec une blastocystose semble dès à présent indispensables. Toutefois, des études plus approfondies restent nécessaires afin de clarifier la circulation et la pathogénicité de *Blastocystis* et son impact réel en santé publique, dans le but de proposer des stratégies de prévention et de lutte anti-parasitaire.

### Références bibliographiques

- (1) Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008 ; **21** : 639–665.
- (2) Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* 2013 ; **82** : 1–32.
- (3) Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996 ; **9** : 563-584.
- (4) Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJ , Vugt M, *et al.* Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect. Dis.* 2013 ; **13** : 389.
- (5) El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, *et al.* Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* 2014 ; **14** : 164.
- (6) Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis Rep.* 2010 ; **12** : 28-35.
- (7) Scanlan PD. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* 2012 ; **28** : 327-334.
- (8) Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell. Microbiol.* 2012 ; **14** : 1474-1484.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

- (9) Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog.* 2014 ; **6** : 17.
- (10) Wu Z, Mirza H, Tan. KS. Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* Subtype-7. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; **8**: e2885.
- (11) Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares C, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 2012 ; **8** : e1002545.
- (12) Tan KSW. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet. Parasitol.* 2004 ; **126** : 121–144.
- (13) Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol. Res.* 2006 ; **98** : 189–193.
- (14) Suresh K, Smith H, Tan T. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005 ; **71** : 5619-5620.
- (15) Ho LC, Singh M, Suresh G, Ng GC, Yap EH. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol. Res.* 1993 ; **79** : 614-616.
- (16) Alexeieff A. Sur les kystes de *Trichomonas intestinalis* dans l'intestin des batraciens. *Bull. Sci. France Belg.* 1910 ; **44** : 333-356.
- (17) Brumpt E. *Blastocystis hominis* n.sp. et formes voisines. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1912 ; **5** : 725-730.
- (18) Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Clin. Pathol.* 1967 ; **48** : 495–501.
- (19) Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature.* 1996 ; **380** : 398.
- (20) Boreham PF, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.* 1993 ; **32** : 1-70.
- (21) Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, *et al.* Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* 2005 ; **43** : 348-355.
- (22) Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, *et al.* Terminology for *Blastocystis* subtypes a consensus. *Trends Parasitol.* 2007 ; **23** : 93-96.
- (23) Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, *et al.* Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist.* 2013 ; **164** : 497–509

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

- (24) Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007 ; **59** : 303-307.
- (25) Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, *et al.* Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology.* 2007 ; **134** : 359-367.
- (26) Dogruman-Al F, Turk S, Adiyaman-Korkmaz G, Hananel A, Levi L, Kopelowitz J, *et al.* A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. *Parasitol. Res.* 2015 ; **114** : 495-500.
- (27) Stensvold CR. *Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop. Parasitol.* 2013 ; **3** : 26-34.
- (28) Yoshikawa H, Dogruman-Al F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol. Res.* 2011 ; **109** : 1045-1050.
- (29) Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IKMD, Hossain MB, *et al.* Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res.* 2004 ; **92** : 22-29.
- (30) Scanlan PD, Stensvold CR, Cotter PD. Development and application of a *Blastocystis* subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015 ; **81** : 4071-4076.
- (31) Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 2011 ; **49** : 975-983.
- (32) Stensvold CR, Ahmed UN, Andersen LO, Nielsen HV. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2012 ; **50** : 1847-1851.
- (33) Masucci L, Graffeo R, Bani S, Bugli F, Boccia S, Nicolotti N, *et al.* Intestinal parasites isolated in a large teaching hospital, Italy, 1 May 2006 to 31 December 2008. *Euro Surveill.* 2011 ; **16** : 24.
- (34) Gonzalez-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Res.* 2011 ; **108** : 87-93.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

- (35) Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM. Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Br. J. Biomed. Sci.* 2002 ; **59** : 154-157.
- (36) Pinel C, Réjasse C, Picot S, Brenier-Pinchart MP, Grillot R, Ambroise-Thomas P. *Blastocystis hominis*: réflexions épidémiologiques et cliniques à propos de plus de 3500 examens coprologiques. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 1999 ; **57** : 601-604.
- (37) Bourée P. *Blastocystis*: commensal ou pathogène? Etude de 590 cas et revue de la littérature. *Antibiotiques*. 2007 ; **9** : 20-24.
- (38) Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 2013 ; **126** : 11–18.
- (39) Gualdieri L, Rinaldi L, Petrullo L, Morgoglione ME, Maurelli MP, Musella V, *et al.* Intestinal parasites in immigrants in the city of Naples (southern Italy). *Acta Trop.* 2011 ; **117** :196–201.
- (40) Herbinger KH, Fleischmann E, Weber C, Perona P, Loscher T, Bretzel G. Epidemiological, clinical, and diagnostic data on intestinal infections with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* among returning travelers. *Infection*. 2011 ; **39** : 527–535.
- (41) Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, *et al.* Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet. Parasitol.* 2010 ; **169** : 8–17.
- (42) Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, *et al.* Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet. Parasitol.* 2009 ; **160** : 295–300.
- (43) Stensvold, CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, *et al.* Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* 2009 ; **39** : 473–479.
- (44) Wang W, Owen H, Traub RJ, Cuttall L, Inpankaew T, Bielefeldt-Ohmann H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet. Parasitol.* 2014 ; **203** : 264-269.
- (45) Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, *et al.* Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J. Clin. Microbiol.* 2000 ; **38** : 1324-1330.

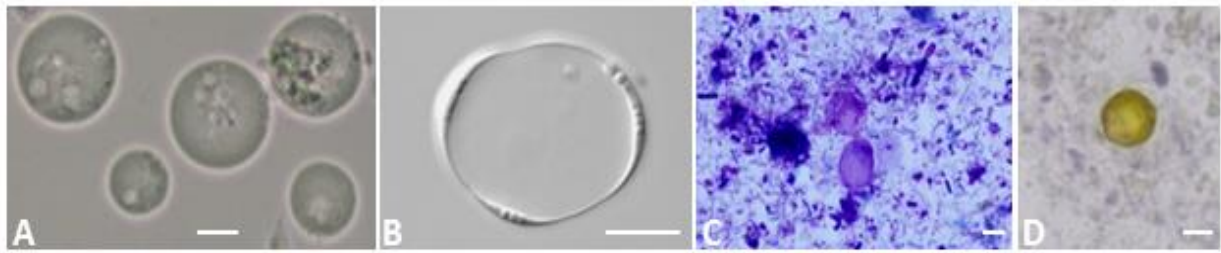
## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

- (46) Thathaisong U, Siripattanapipong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-Ariya P, Naaglor T, *et al.* Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the home for girls, Bangkok, Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013 ; **88** : 352-358.
- (47) Wu G, Xiong Y, Cao G, Li G, Liu MZ, Zhu J. Investigation of an epidemic outbreak of blastocystosis. *Chin. J. Parasitol. Dis. Control.* 2000 ; **13** : 25-7.
- (48) Lee LL, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK. *Blastocystis* sp.; waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasit. Vectors.* 2012 ; **5** : 130.
- (49) Cruz Licea V, Plancarte Crespo A, Morán Álvarez C, Valencia Rojas S, Rodriguez Sanchez G, Vega Franco L. *Blastocystis hominis* among food vendors in xochimilco markets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2003 ; **45** : 12–15.
- (50) Wawrzyniak I, Courtine D, Osman M, Hubans-Pierlot C, Cian A, Nourrisson C, *et al.* Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4 isolate WR1. *Genom. Data.* 2015; **4** : 22-23.
- (51) Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M *et al.* Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 2011; **12** : R29.
- (52) Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Meloni D, Texier C, Delbac F, *et al.* *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 2013; **5** : 167-178.
- (53) Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect. Immun.* 2006 ; **74** : 4114-4123.
- (54) Wu Z, Mirza H, Teo JDW, Tan KSW. Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in caspase 3- and 9-dependent manner. *Biomed. Res. Int.* 2014; **2014** : 209163.
- (55) Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KSW. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol. Res.* 2005 ; **97** : 386-389.
- (56) Puthia MK, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kB-dependent manner. *Euk. Cell.* 2008; **7** : 435-443.
- (57) Iguchi A, Yoshikawa H, Yamada M, Kimata I, Arizono N. Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. *Parasitol. Res.* 2009 : **105**; 135-140.

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

- (58) Lim MX, Png CW, Tay CY, Teo JD, Jiao H, Lehming N, *et al.* Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infect. Immun.* 2014; **82** : 4789-4801.
- (59) Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, *et al.* Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol. Res.* 1997 ; **83** : 319–325.
- (60) Mirza H, Wu Z, Kidwai F, Tan KSW. A metronidazole-resistant isolate of *Blastocystis* spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. *Infect. Immun.* 2011 ; **79** : 5019-5026.
- (61) Janarthanan S, Khoury N, Antaki F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy.* 2011 ; **43** : E185–E186.
- (62) Fréal E, El Safadi D, Cian A, Aubry E, Certad G, Osman M, *et al.* Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.* 2015 ; **21** : 91-94.
- (63) Stark D, van Hal S, Marriott D, Elis J, Harkness J. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int. J. Parasitol.* 2007 ; **37** : 11–20.
- (64) Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol.* 2009 ; **25** : 23-29.
- (65). Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMango C, Wawrzyniak I, Cian A, *et al.* *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One.* 2014 ; **9** : e111868.
- (66) Kurniawan A, Karyadi T, Dwintarsi S, Sari I, Yuniastuti E, Djauzi S, *et al.* Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2009 ; **103** : 892-898.
- (67) Alemu A, Shiferaw Y, Getnet G, Yalew A, Addis Z. Opportunistic and other intestinal parasites among HIV/AIDS patients attending Gambi higher clinic in Bahir Dar city, North West Ethiopia. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2011 ; **4** : 661-665.
- (68) Adamu H, Wegayehu T, Petros B. High prevalence of diarrhoeagenic intestinal parasite infections among non-ART HIV patients in Fitcha Hospital, Ethiopia. *PLoS One.* 2013 ; **8** : e72634.
- (69) Lepczynska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? *Int. J. Dermatol.* 2015 ; **55** : 259-266.
- (70) Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: to treat or not to treat... *Clin. Infect. Dis.* 2012 ; **54** :105–110.





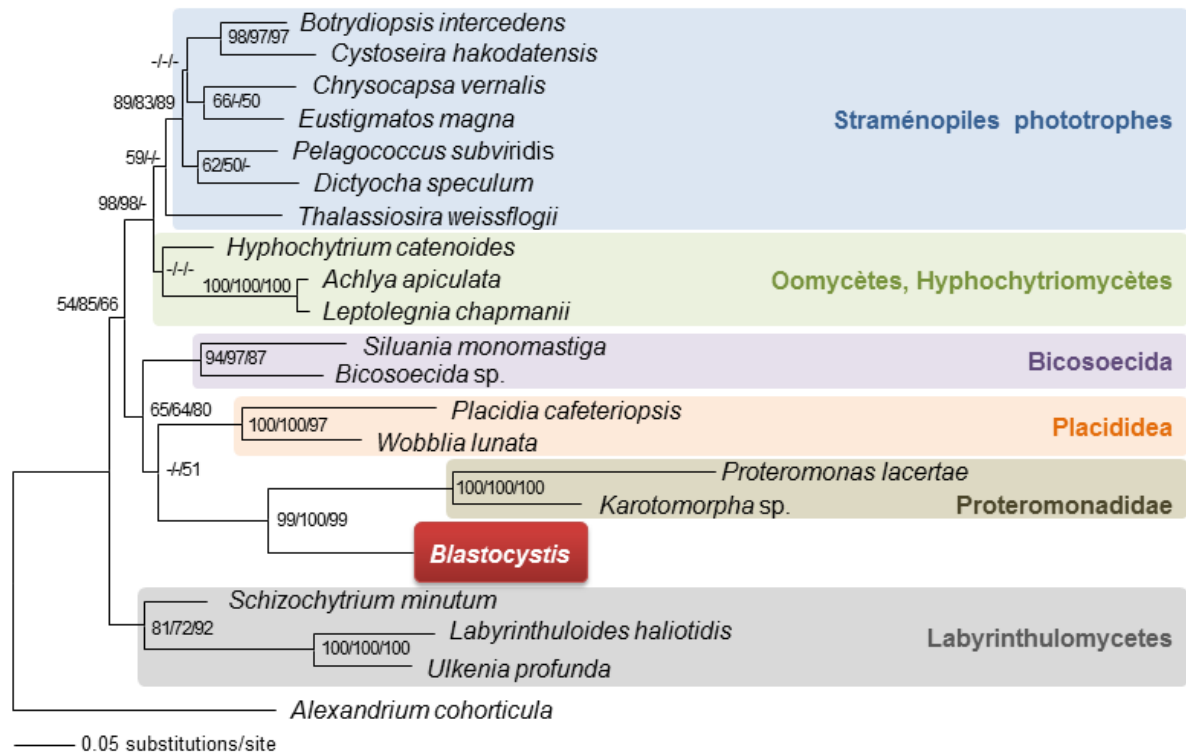
**Fig 1 – Formes vacuolaires de *Blastocystis*.**

Culture de *Blastocystis* : observation au microscope à contraste de phase (A) et à contraste interférentiel (B). La vacuole centrale occupe la quasi-totalité du volume de la cellule et repousse les différents organites vers la périphérie cellulaire.

Frottis de selles coloré au Giemsa © et au Para-Selles Kop-Color – MIF Fumouze (Merthiolate-formol et lugol) (D).

La barre d'échelle est égale à 10µm

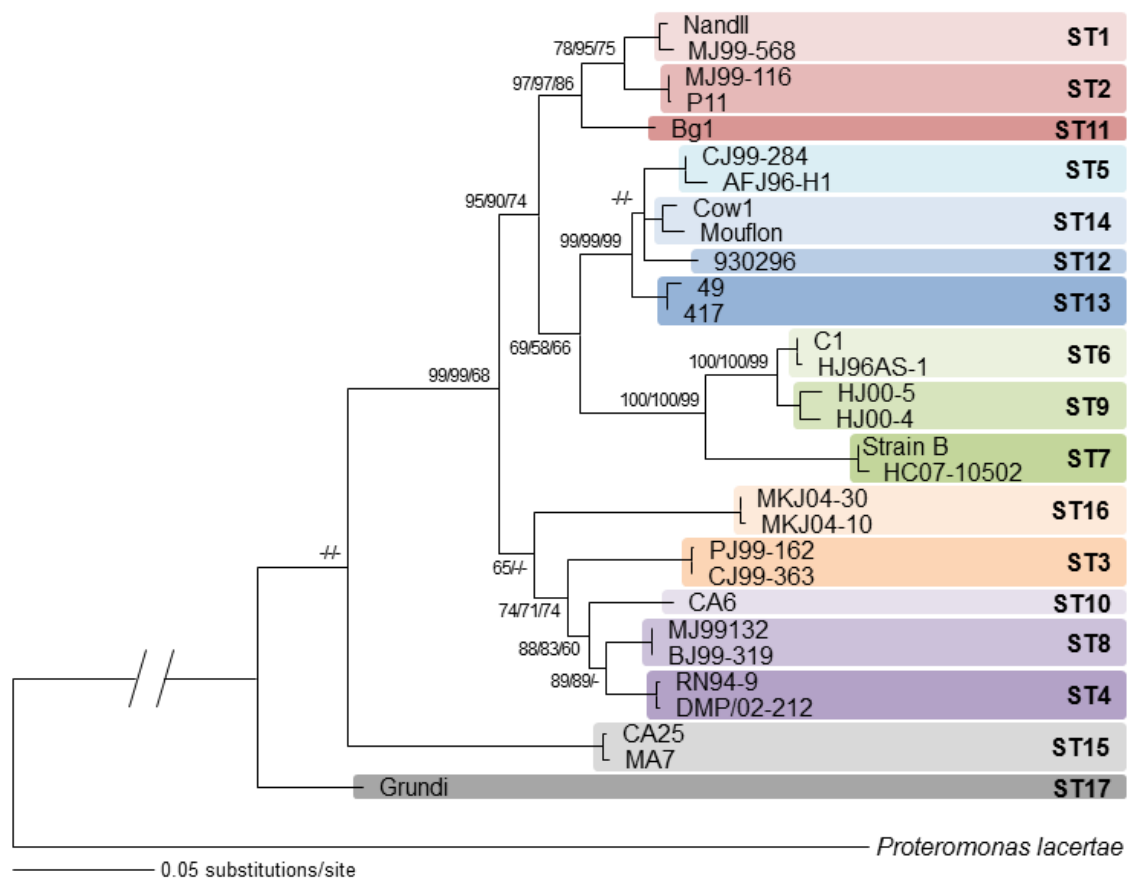
# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE



**Fig 2 – Phylogénie des straménopiles établie par comparaison des séquences du gène de l’ARNr 18S.**

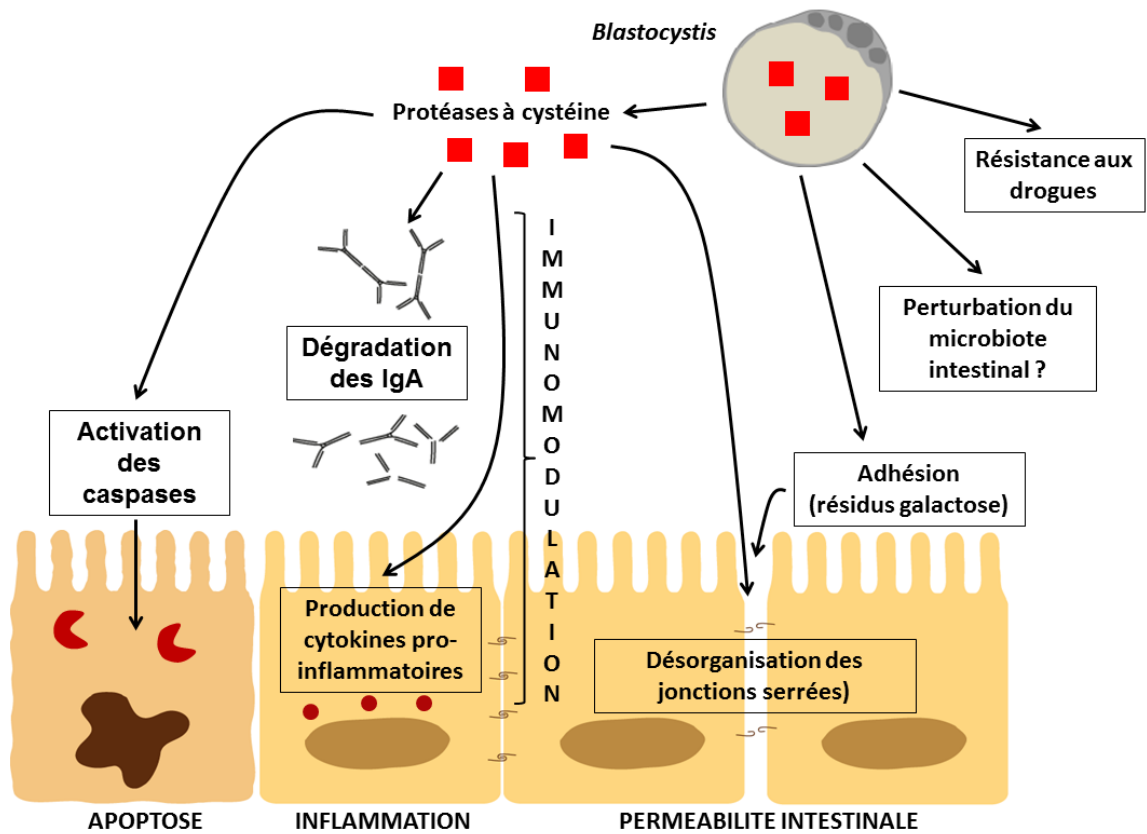
Cet arbre phylogénétique, obtenu par la méthode de maximum de vraisemblance, a été enraciné sur le dinoflagellé *Alexandrium cohorticula* qui appartient au phylum des Alveolata et qui est phylogénétiquement proche des straménopiles. On note l’émergence de *Blastocystis* au sein des straménopiles hétérotrophes et un lien de parenté statistiquement soutenu avec le groupe des Proteromonadidae. Les valeurs indiquées à chaque nœud correspondent aux valeurs de *bootstrap* (en pourcentages) obtenues pour tester la fiabilité de l’arbre par 3 méthodes différentes de reconstruction d’arbres (méthodes de maximum de vraisemblance, de distance et de parcimonie). Les valeurs inférieures à 50% sont indiquées par un tiret (-). L’échelle indique le nombre de substitutions par site.

# ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE



**Fig 3 - Phylogénie du genre *Blastocystis* définie par comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S.**

Cet arbre phylogénétique obtenu par la méthode de maximum de vraisemblance a été enraciné sur le straménopile *Proteromonas lacertae* qui est phylogénétiquement proche de *Blastocystis*. Les 17 STs identifiés au sein du genre *Blastocystis* peuvent chacun représenter une espèce du fait des distances évolutives observés entre STs. Les ST1 à ST9 ont été retrouvés chez l'Homme avec des fréquences variables. Les valeurs indiquées à chaque nœud correspondent aux valeurs de *bootstrap* (en pourcentages) obtenues par 3 méthodes différentes de reconstruction phylogénétique (méthodes de maximum de vraisemblance, de distance et de parcimonie). Les valeurs inférieures à 50% sont indiquées par un tiret (-). Les valeurs au sein des STs ne sont pas indiquées mais sont toutes supérieures à 80%. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.



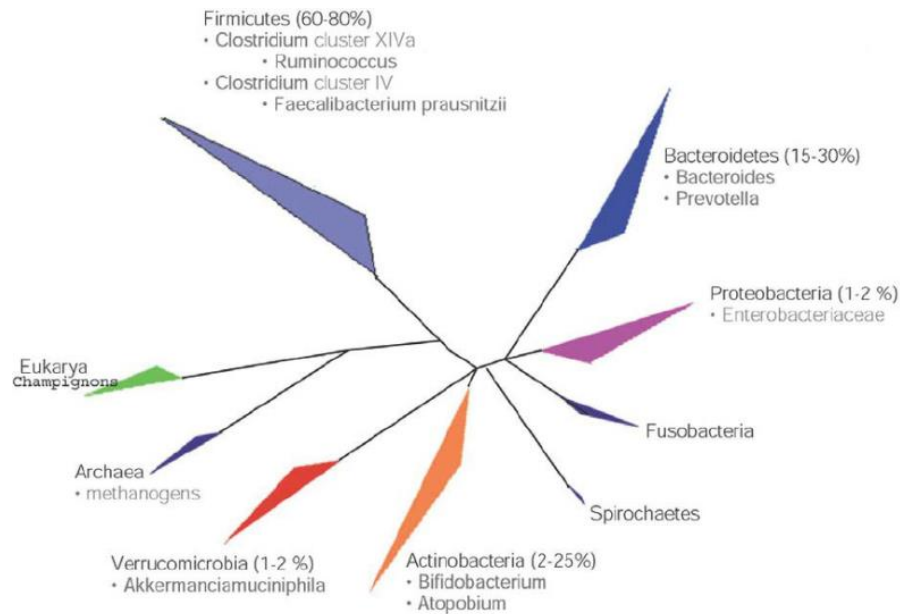
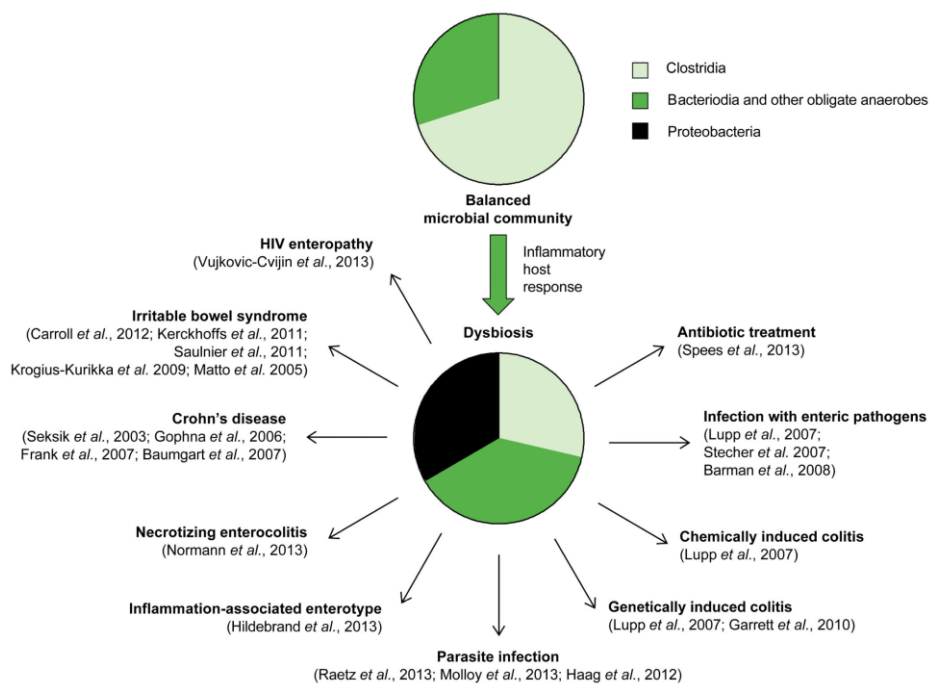
**Fig 4 – Modèle résumant les différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de *Blastocystis*.**

Brièvement, les protéases à cystéine sécrétées par le parasite induisent l'activation des caspases de la cellule hôte et l'apoptose de celle-ci, la dégradation des IgA à la surface de l'épithélium intestinal, la réorganisation des jonctions serrées via l'adhésion du parasite et la production de cytokines pro-inflammatoires. La combinaison de tous ces mécanismes entraînent une régulation de la réponse immunitaire de l'hôte, une inflammation et une modification de la perméabilité intestinale.

## 2. *Blastocystis* sp. et le microbiote intestinal

Aujourd'hui, le microbiote intestinal, regroupant l'ensemble des micro-organismes du tractus digestif, est considéré comme un organe à part entière remplissant différentes fonctions qu'elles soient métaboliques, structurelles ou de protection (O'Hara et Shanahan, 2006). Au sein de ce microbiote, les bactéries sont les microorganismes majoritaires avec une prédominance de 3 phyla en l'occurrence les Bacteroidetes (*Bacteroides* et *Prevotella*), les Firmicutes (*Ruminococcus* et *Faecalibacterium*) et les Actinobacteria (*Bifidobacterium*) (Cheng et al., 2013 ; Bourlioux, 2014) (**Figure A2A**). Ce microbiote intestinal est dominé par des espèces bactériennes anaérobies strictes voir d'espèces extrêmement sensibles à l'oxygène. Cependant, des bactéries anaérobies facultatives comme les Enterobactéries sont trouvées mais en nombre relativement faible dans le microbiote adulte. On estime ainsi que cet écosystème intestinal est composé, chez un individu sain, de 1000 espèces moléculaires dont 60 à 70% seraient à ce jour non cultivées (Qin et al., 2010). De même qu'il existe des groupes sanguins, trois « entérotypes » ou signatures bactériennes intestinales, ont été identifiés chez l'Homme en 2011 par Arumugam et al. (Projet européen MetaHit : Metagenomics of the Human Intestinal Tract) principalement déterminés par l'abondance de certains genres bactériens. Ainsi, le Type 1 (ou enterotype *Bacteroides*) est caractérisé par de hauts niveaux de *Bacteroides*, le Type 2 (ou enterotype *Prevotella*) à peu de *Bacteroides* mais beaucoup de *Prevotella* et le type 3 (ou enterotype *Ruminococcus*) à un haut niveau de *Ruminococcus*. Deux de ces entérotypes ont pu être reliés à deux types d'alimentation (Wu et al., 2011): *Bacteroides* se développe chez les sujets dont l'alimentation est riche en viande et en graisse animale comme dans les pays occidentaux et *Prevotella*, à l'inverse, trouve son bonheur chez les sujets adeptes des repas très sucrés. L'enterotype *Ruminococcus*, quant à lui, apprécie les gros consommateurs d'alcool.

L'altération de la composition de cette communauté microbienne intestinale, appelée communément dysbiose, joue un rôle important au niveau de différentes pathologies associées, en particulier, à une inflammation chronique de l'intestin qu'elle soit d'origine métabolique ou infectieuse. Comme nous l'avons vu précédemment, le pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp. reste encore controversé malgré l'identification de molécules et mécanismes impliqués dans la pathogénie du parasite (voir Figure 4 **Article 1**; Ajjampur et Tan, 2016). Cependant, il a été montré que la prévalence de *Blastocystis* sp. pouvait être élevée chez des sujets asymptomatiques et que le parasite pouvait coloniser un individu pendant plusieurs années sans pour autant entraîner de symptômes (Scanlan et Marchesi, 2008 ; Scanlan et al.,

**A****B**

**Figure A2:** Représentation de la répartition des communautés microbiennes intestinales associées à un organisme sain et à l'inflammation du tractus gastro intestinal inférieur. **(A)** Arbre phylogénétique des bactéries résidant dans le côlon d'un individu sain. La proportion des différents phyla dans le microbiote intestinal total est précisée entre parenthèses. Les groupes, genres et espèces bactériennes qui peuvent être importants pour la santé humaine sont indiqués (Cheng *et al.*, 2013). **(B)** Pathologies intestinales pour lesquelles une dysbiose a été observée (Winter et Bäumler, 2014).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2014). Plus récemment, des études menées chez des sujets atteints du SII ou de rectocolite hémorragique (RCH) ont mis en évidence une prévalence de *Blastocystis* sp. plus faible chez ces sujets comparés aux patients d'une population contrôle ne présentant pas ces pathologies (Krogsgaard et al., 2015 ; Rossen et al., 2015). Il a également été montré que la prévalence de *Blastocystis* sp. était plus élevée chez les patients présentant une RCH chronique que chez ceux atteints de RCH aiguë (Petersen et al., 2013). Or, des études antérieures s'accordaient à dire que la prévalence de *Blastocystis* sp. était plus élevée chez les sujets SII (Stark et al., 2007 ; Boorom et al., 2008 ; Poirier et al., 2012). Au regard de l'ensemble de ces données qui pour certaines sont contradictoires, le lien entre *Blastocystis* sp. et certaines pathologies intestinales reste encore obscur. En outre, cela pose clairement la question de l'influence de la composition du microbiote de patients atteints de pathologies intestinales sur la colonisation par *Blastocystis* sp.

Depuis 2005, l'avènement des techniques de séquençage à haut débit (HTS) a permis le développement de la métagénomique et l'étude, entre autres, de la composition du microbiote intestinal humain. Dans ce cadre, le séquençage de génomes entiers (ou Whole-genome shotgun sequencing) reste encore aujourd'hui très coûteux et l'analyse de ces données n'est pas aisée en raison à la fois de la taille et de la structure complexe de ces génomes. Parallèlement, la métagénomique ciblée, aussi appelée métagénétique, s'est développée et se concentre sur un marqueur génomique informatif tel que l'ADNr 16S. Aujourd'hui, et grâce à l'utilisation de « séquenceurs de paille » (tels que les technologies Ion Torrent ou MiSeq), ces études de métagénétique sont devenues très répandues dans l'étude du microbiote bactérien. Au début de ma thèse, aucune association entre *Blastocystis* sp. et le microbiote intestinal n'avait été recherchée alors que l'étude de ce dernier en présence ou non du parasite permettrait d'évaluer l'impact éventuel d'une colonisation.

Pourtant, des études récentes tendent à démontrer l'impact des parasites entériques sur le microbiote intestinal. Ainsi, des modifications du microbiote caractérisées par une augmentation des bactéries gram négatif ont été mises en évidence chez des souris infectées par deux isolats de *Cryptosporidium parvum* (Ras et al., 2015). Cependant, les auteurs supposent que *Cryptosporidium* a un effet indirect sur le microbiote intestinal. En effet, il ne s'agirait pas d'une interaction parasite-microbiote à proprement parlé mais plus d'une modification de ce microbiote suite aux altérations de l'épithélium intestinal induites par le parasite. *Toxoplasma gondii* serait quant à lui responsable d'une dysbiose intestinale sévère puisque l'infection de souris C57BL/6 a permis d'identifier une diminution des Bacteroidetes et des Firmicutes aux profits des Proteobacteria (Raetz et al., 2013). Ce profil de microbiote

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

est similaire à celui reporté pour les personnes atteintes du SII ou de maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) (**Figure A2B**). Par contre, d'autres études mettent en évidence une corrélation entre la présence de parasites entériques et un microbiote intestinal « sain », comme pour *Entamoeba* spp. par exemple (Morton et al., 2015). Dans cette dernière étude, une comparaison de la composition du microbiote chez des sujets porteurs ou non d'*Entamoeba* spp. a été réalisée et a permis de conclure que la présence de ce parasite était corrélée à une augmentation de l'alpha-diversité avec notamment une augmentation des Ruminococcaceae et une diminution de *Prevotella copri*.

En ce qui concerne *Blastocystis* sp., une analyse rétrospective des données de métagénomiques issues du consortium MetaHIT et confirmées par une approche par PCR quantitative (qPCR) a permis de montrer que ce parasite était peu présent chez les personnes ayant un entérotype *Bacteroides* comparé aux personnes ayant un entérotype *Prevotella* ou un entérotype *Ruminococcus* (Andersen et al., 2015, Andersen et Stensvold, 2016). Ces auteurs ont également indiqué que l'entérotype *Bacteroides* était celui qui présentait le moins de diversité bactérienne. Ainsi, la présence de *Blastocystis* sp. serait corrélée à un microbiote intestinal présentant une diversité bactérienne importante. Il est cependant à noter qu'aujourd'hui, la notion même d'entérotype est remise en cause (Koren et al., 2013 ; Knights et al., 2014). En effet, plusieurs auteurs ne parlent plus d'entérotypes et de clusters bien distincts mais plutôt d'un gradient de communautés bactériennes entre les entérotypes *Bacteroides* et *Prevotella*. Quoiqu'il en soit, toutes les données obtenues sur *Blastocystis* sp. couplées à sa possible colonisation à long terme chez des personnes asymptomatiques (Scanlan et Marchesi, 2008 ; Scanlan et al., 2014), suggèreraient que sa présence ne serait pas associée au microbiote généralement observé chez les personnes atteintes de pathologies intestinales telles que les MICI ou le SII.

### **3. Génomes nucléaire et « mitochondrial » de *Blastocystis* sp.**

Comme décrit précédemment (Par.1.III.), les isolats de *Blastocystis* sp. présentent une grande diversité génétique sur la base de la comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S. Cette diversité a abouti à la création de nombreux STs au nombre aujourd'hui de 17 pour les isolats de mammifères et d'oiseaux (Alfellani et al., 2013a) auxquels s'ajoutent d'autres STs potentiels identifiés chez les reptiles et les insectes (Yoshikawa et al., 2016a). Brièvement, plusieurs études récentes menées *in vitro* suggèrent que la virulence du parasite pourrait être ST-dépendante et que cette virulence présenterait des variations entre isolats d'un même ST (Wu et al., 2014a, b ; Ajjampur et al., 2016 ; Yason et al., 2016). Cette seule



## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

observation pourrait ainsi aisément expliquer le portage asymptomatique du parasite chez de nombreux patients puisque une proportion encore indéterminée des isolats ne serait pas virulente. Cette situation peut ressembler à celle observée pour *Giardia* où de nombreuses infections sont asymptomatiques (Tellevik et al., 2015) et pour *Entamoeba histolytica* où la proportion d'infections symptomatiques ne dépasse pas 10% (Haghighi et al., 2003 ; Pritt et Clark, 2008). Cette variation dans la virulence des isolats de *Blastocystis* sp. pourrait alors s'expliquer par de simples différences génomiques en relation avec la présence ou l'absence de certains facteurs de virulence. Afin de répondre à cette interrogation et tout en apportant de nombreuses données concernant la biologie du parasite, des études de génomique ont été récemment initiées pour ce parasite.

### I. - Le génome nucléaire

Le séquençage du premier génome de *Blastocystis* sp. a été publié en 2011 par Denoed et al. et concernait un isolat de ST7 (souche B) obtenu chez un patient symptomatique de Singapour. Par électrophorèse en champs pulsé, 15 bandes chromosomiques ont été identifiées et la taille du génôme déduite de l'assemblage était de 18,8 Mpb. Si on compare cette taille à celles observées pour d'autres Straménopiles telles que *Phytophthora infestans* (240 Mpb), *P. sojae* (95 Mpb), *P. ramorum* (65 Mpb) ou *Thalassiosira pseudonana* (34,5 Mpb), *Blastocystis* sp. présente donc à ce jour, le plus petit génome de ce groupe diversifié d'organismes. Comme *Blastocystis* sp. est aussi le seul Straménopile connu pouvant parasiter l'Homme, il a été suggéré que cette taille réduite du génome pouvait refléter un processus d'adaptation de ce microorganisme au parasitisme (Denoed et al., 2011). En effet, une forte compaction du génome de cet isolat a été mise en évidence avec des régions inter-géniques (longueur moyenne d'environ 1,800 pb) et des introns (moyenne de 32 pb) de tailles réduites. Le nombre de gènes prédits après annotation était de 6020 couvrant environ 42% du génome. Là encore, ce nombre est faible puisque 2 à 3 fois inférieur à celui observé pour les autres Straménopiles dont les génomes ont été séquencés. De plus, une proportion importante de ces gènes semblait dupliquée (environ 20%) suggérant des duplications récentes de segments génomiques pour cet isolat.

Dans ce génome, pas moins de 38 unités d'ADNr ont été identifiées et s'organisent de la manière suivante : une petite sous-unité ADNr 18S (1,8 kb), une unité ADNr 5,8S (0,44 kb) et une grande sous-unité ADNr 28S (2,45 kb). L'alignement des séquences complètes de 17 gènes de l'ADNr 18S a mis en évidence un important polymorphisme intra-génomique. En

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

effet, le pourcentage d'identité entre les différentes copies de ce gène varie de 98,1% à 99,9% (i.e. 1 à 38 nucléotides différents entre les copies du même gène) (Poirier et al., 2014). Or, ce gène est utilisé comme marqueur dans le cadre du sous-typage des isolats. De ce fait, ce marqueur n'est a priori pas suffisamment informatif pour différencier des isolats appartenant à un même ST d'où le développement récent d'autres marqueurs permettant d'évaluer cette variation intra-ST (Poirier et al., 2014).

Parmi ces 6020 gènes, 133 d'entre eux sont potentiellement issus d'un transfert horizontal de gènes puisqu'ils présentent des homologies de séquences avec des gènes de bactéries et d'archaea. C'est par exemple le cas de deux gènes dont l'origine pourrait se trouver au sein du groupe des cyanobactéries et qui naturellement pose la question de la présence antérieure possible de chloroplastes chez *Blastocystis* sp. D'autres gènes acquis par transfert horizontal peuvent avoir facilité l'adaptation de *Blastocystis* sp. au parasitisme. C'est le cas en particulier de ceux codant les Major Facilitator Transporter (MSF) qui sont connus chez les bactéries pour faciliter le transport de substrats à travers les membranes et qui pourraient conférer au parasite la capacité à absorber des nutriments dans la lumière intestinale ou lors de son interaction avec les tissus de l'hôte. C'est aussi le cas de ceux codant des cadhérines qui correspondent à une large famille de protéines d'adhésion calcium-dépendantes et qui peuvent donc être impliquées dans l'adhésion du parasite à l'épithélium intestinal. Récemment, Fletcher et al. (2016) ont d'ailleurs montré que ces cadhérines formaient une nouvelle famille appelée « Nonagonal cadherins » restreinte aux Straménopiles et dont la fonction reste encore à clarifier.

L'analyse *in silico* du sécrétome de *Blastocystis* sp. a aussi permis d'identifier de nombreuses protéines pouvant être impliquées dans la pathogénie du parasite. Sans rentrer dans les détails puisque cette partie est développée précédemment (Par.1.IX), c'est le cas des protéases à cystéine qui sont connues chez d'autres parasites (Klemba et Goldberg, 2002) pour jouer un rôle majeur dans l'interaction hôte-parasite, des inhibiteurs de protéases pour perturber l'homéostasie intestinale, des hydrolases qui dégraderaient le mucus intestinal ou encore des Transporteurs « ATP-binding Cassette » (ABC Transporter) contribuant à la multi-résistance aux drogues. Or, plusieurs études de cas cliniques rapportent une résistance au métronidazole d'isolats de *Blastocystis* sp. alors que cette drogue est utilisée en première intention dans les cas avérés de blastocystose (Roberts et al., 2014).

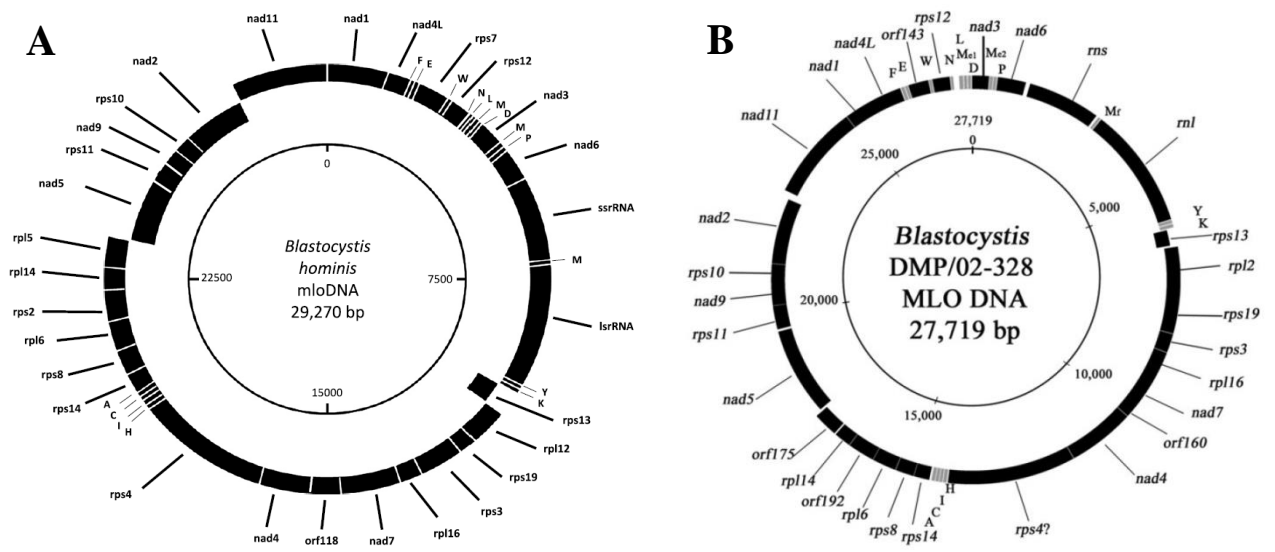
## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

### II. - Le génome « mitochondrial »

Bien qu'étant un anaérobie strict, *Blastocystis* sp. a la particularité de posséder des mitochondries « dégénérées » appelées mitochondria-like organelles ou MLO qui, sans rentrer dans les détails, partagent plusieurs caractéristiques avec les mitochondries classiques comme les crêtes mitochondriales, un potentiel membranaire et un génome associé (Nasirudeen et Tan, 2004). Par contre, ces MLOs partagent aussi des caractéristiques normalement associées à des organites anaérobies dérivés des mitochondries tels que les hydrogénosomes et les mitosomes (van der Giezen et Tovar, 2005 ; Stechmann et al., 2008). Ces données suggèrent une transformation des mitochondries en MLOs chez *Blastocystis* sp. sous la pression d'un mode de vie anaérobie et une « position évolutive » des MLOs intermédiaire entre mitochondries et hydrogénosomes / mitosomes.

Les MLOs contiennent un génome circulaire de petite taille avoisinant les 30 kb. C'est en 2008 que les premiers génomes de MLOs ont été séquencés pour des isolats appartenant aux ST1, ST4 (Pérez-Brocal et Clark, 2008) et ST7 (Wawrzyniak et al., 2008) (**Figure A3**). La taille des génomes des MLOs de ces différents STs est comprise entre 27 et 29 kb et leur alignement montre une parfaite synténie. En effet, les 3 génomes analysés englobent 45 gènes : 10 codent des sous-unités de la NADH ubiquinone oxydoréductase (nad), 5 des grosses protéines ribosomales (rpl), 11 des petites protéines ribosomales (rps) et 1 une protéine inconnue (orf118). A cela s'ajoutent 16 gènes codant des ARNt et deux des ARNr (petite et grande sous-unité). Concernant ce gène codant pour l'ARNr 18S mitochondrial qui est en copie unique, il a été récemment utilisé comme marqueur potentiel de sous-typage (Poirier et al., 2014). En effet, une région d'intérêt de ce gène d'environ 500 pb permet de discriminer aisément les différents STs tout en analysant la variation intra-ST.

Ces génomes de MLOs présentent des similarités avec le génome mitochondrial comme un pourcentage riche en AT (environ 80%), une forte densité génique et la présence de gènes codant des sous-unités du complexe I de la phosphorylation oxydative. Cependant les gènes codant les autres complexes (II, III, IV, V) sont absents de ce génome mitochondrial alors qu'ils sont habituellement retrouvés dans les génomes des mitochondries aérobies (Pérez Brocal et Clark, 2008 ; Wawrzyniak et al., 2008). L'absence de ces gènes dans le génome mitochondrial de *Blastocystis* sp. peut là encore s'expliquer par l'évolution du parasite en réponse aux contraintes liées à un environnement anaérobie.



**Figure A3:** Représentations des génomes des MLOs de *Blastocystis* sp. ST7 (A) (Wawrzyniak et al., 2008) et de *Blastocystis* sp. ST4 (B) (Pérez Brocal et Clark, 2008)

### 4. Modèles animaux de blastocystose

Malgré toutes les études réalisées chez l'animal et détaillées ci-dessous, aucun modèle reproductible de blastocystose n'a pourtant été, à ce jour, validé ce qui représente l'un des principaux freins dans l'optique de clarifier la pathophysiologie de *Blastocystis* sp. Pour bon nombre de ces travaux, on se doit de rester très prudent sur les observations réalisées et sur les conclusions avancées. En effet, pour une majorité de ces études, les images d'histologie sont rares, inexistantes ou au mieux souvent discutables et les contrôles des animaux et des inocula, indispensables avant toute infection expérimentale, ne sont généralement pas réalisés. Par exemple, plusieurs travaux ont été menés sur des animaux dont la provenance n'est pas particulièrement documentée et dont l'état sanitaire, en particulier vis-à-vis de certaines infections comme celle à *Blastocystis* sp., n'était pas vérifié en début d'expérimentation. De plus, certains inocula sont plus que « douteux » et loin d'être axéniques. C'est le cas par exemple des kystes obtenus après « nettoyage » de selles humaines ou de certaines cultures de selles injectés aux animaux sans vérification microbiologique et virologique de l'inoculum. Difficile alors de croire qu'un isolat de *Blastocystis* sp. puisse à lui seul entraîner la mort d'animaux infectés expérimentalement.

Récemment, une revue d'Ajjampur et Tan (2016) a repris et détaillée toutes ces études réalisées chez différents modèles animaux (voir synthèse **Tableau A1** des études menées chez le rat et la souris). Nous nous sommes donc contentés de ne mentionner que les travaux nous semblant majeurs ou non repris dans cette revue et menés chez le rat et la souris mais aussi chez le poulet. Chez ce dernier hôte, des infections ont été réalisées avec succès par voie intra-caecale à partir d'isolats issus de la même espèce ou d'espèces différentes (caille et oie) mettant ainsi en évidence une transmission possible entre espèces d'oiseaux (Tanizaki et al., 2005). Dans cette même étude, un poulet non infecté a été rapidement parasité en ayant été mis en contact dans la même cage avec des poulets infectés. Ces données ont permis de confirmer à nouveau que la forme kystique excrétée dans les selles était la forme de transmission du parasite et que le principal mode de transmission de *Blastocystis* sp. était la voie féco-orale. Dans une seconde étude, des isolats issus de selles humaines et appartenant aux ST4, ST6 et ST7 étaient capables d'infecter des poulets confirmant ainsi la faible spécificité d'hôte de certains STs (Iguchi et al., 2007).

La majorité des infections expérimentales a cependant été réalisée chez la souris et le rat comme mentionné par Ajjampur et Tan (2016). D'après les données disponibles dans la littérature, la souris ne semble pourtant pas être un bon modèle dans le cadre d'infections

**Tableau A1:** Synthèse des études réalisées *in vivo* chez les rongeurs et focalisées sur la transmission et la physiopathologie de *Blastocystis* sp. (Ajjampur et Tan, 2016).

Year	Author	Animal model	Parasite description	Route	Detection methods	Read outs	Relevant findings	Limitations
1993	Suresh [59]	4 week old Wistar rats pre-screened for <i>Blastocystis</i>	Isolate C, axenic with cysts/Isolate MS, non-axenic, trophic forms (Human source)	Oral: C: $10^4$ ; Isolate MS: $10^{4-6}$	Stool; Histology	Infection seen by day 2 for isolate C, no infection with isolate MS; On day 7, infection in caecum with isolate C not MS	<i>Infection by oral route requires cyst stage</i>	Absence of xenic culture associated microflora controls
1997	Moe [36]	2 to 8 week old BALB/c screened to be <i>Blastocystis</i> negative	Human sample/? ST/Concentrated cysts  Human Diarrhea/ST7/Axenic culture	Oral: $10^{2-6}$  Intra-caecal: $4-8 \times 10^6$	Fecal microscopy and culture; Histology	Cyst: 2-6 week old mice were positive for <i>Blastocystis</i> infection up to 2 weeks while 8 week old mice were resistant; Intra-caecal - all 4 week old mice infected up to 3 weeks followed by recovery; Macroscopically caecal tissue bloated <i>Vacuolar and granular forms in caecum and cyst forms in colon - seen mainly in luminal content and in mucosa; No invasive lesions; Intense inflammatory infiltrates, edematous lamina propria with mucosal sloughing in proximal and distal colon</i>	<i>Age related susceptibility in mice with acute, self-limiting course of infection</i>  <i>Luminal and mucosal localization of the parasite</i>	Goblet cells not documented
1998	Moe [73]	6-8 week old BALB/c mice	Human Diarrhea/ST7/Isolate B/axenic	I/M: live and fixed $5 \times 10^5$	Histology	Inflammation within 1 h with increase in PML, necrosis and vasodilatation over time; Recovery and regeneration from 48 h. Fixed cells caused mild to no inflammation	<i>Inflammatory potential and chemoattractant properties of Blastocystis spp.</i>	No serum cytokine or general markers of tissue inflammation tested
2001	Abou El Naga [69]	4 week old Swiss albino mice	Human diarrhea/?ST/Cyst from fecal samples	Oral: $10^4$	Histology	All mice infected by Day 5, granular, vacuolar and cysts stages seen in the luminal contents and mucosal edge of large intestine with intense inflammation, sloughing of mucosa and edema. Moderate inflammation and hemorrhage in small intestine	Similar to previous findings by Moe et al.	Absence of xenic culture associated microflora controls; No mention of prior screening for <i>Blastocystis</i> spp.; No details on subtype
2004	Yoshikawa [58]	3 week old SPF Wistar male rats	RN 94-9/Brown Norway Rat/ST4/-Xenic culture	Oral: $10^5-4 \times 10^7$	Fecal and intestinal content culture; Co-housing with uninfected rat; Infectivity of cysts from feces;	All RN 94-9 rats culture positive after oral inoculation due to presence of cysts; NIH 1295;1 rats positive only after intra caecal inoculation; Feco-oral transmission in 9 and 15 days respectively; Infectivity of up to 100% demonstrated with viable cyst concentrations ranging from 10 to 1000; Cyst forms seen in caecum and large intestine but not in small intestinal contents	<i>Feco-oral transmissibility of cysts in animal model; Strain dependent variability in infectivity probably influenced by presence of cysts in culture; Predominant morphological forms in different gut segments</i>	Absence of xenic culture associated microflora controls; No mention of prior screening for <i>Blastocystis</i> spp.
2005	Yao [62]	4 week old female ICT mice screened to be <i>Blastocystis</i> negative	NIH 1295:1/Guinea Pig/ST4/Xenic culture Human diarrhea/ST7/Xenic culture	Intra-caecal: $5 \times 10^6$ Oral: $10^{4-6}$	Intestinal contents; Histology	<i>Blastocystis</i> spp. seen in all segments of the intestinal tract up to the stomach; Edema in mucosa of normal mice (recovery in 7-14 days) and inflammatory infiltrates and epithelial desquamation in mice immunosuppressed with cyclophosphamide with longer recovery of 4-6 weeks	<i>Used immunosuppressed animal model with demonstrable increase in susceptibility, severity of disease and delay in recovery</i>	No details on subtype

**Tableau A1 : Suite**

Year	Author	Animal model	Parasite description	Route	Detection methods	Read outs	Relevant findings	Limitations
2006	Zhang [61]	Kunming mice	Cyst	Rectal: $10^6$ Oral: $2 \times 10^4$	TEM/SEM	<i>Blastocystis</i> localized to lumen and iliocaecal mucosa; destruction of microvilli, mitochondrial edema, rough endoplasmic reticulum dilatation and degranulation in absorptive and goblet cells; lymphocyte and eosinophilic infiltrates in mucosa <i>Mice immunosuppressed with dexamethasone had more severe disease</i>	Descriptive EM images of <i>Blastocystis</i> spp. in the intestinal tract	No details on subtype
2007	Iguchi [37]*	3 week old SPF Wistar male rats screened to be <i>Blastocystis</i> negative	Human samples/ST2,3,4 and 7/Xenic culture	Intra-caecal: $5 \times 10^6$	Fecal culture; genotyping; cyst infectivity	ST2-infected chickens with cyst formation; ST4,7 - chickens and rats with cyst formation; ST3-lower infection rates and no cysts found; Cysts and trophic forms obtained were confirmed as identical to that inoculated; ST2, 4 and 7 cysts resulted in infection in naive rats and chickens with least dose required for ST2	<i>Subtype and strain dependent variation in infectivity, variation in host susceptibility and in host encystation</i>	Absence of xenic bacterial culture controls
2007	Hussein [38]	1 week old Hy-line Laura male chicks 4 week old Wistar male rats	Human Diarrhea (ST1, ST3, ST4)/Xenic culture	Oral: $4 \times 10^7$	Histological score; Ussing chamber	Infected up to 6 weeks later; ST1 and 3 symptomatic strain associated severe pathology, <i>ST1 associated precancerous polyps in mucosa</i> , ST2 and 4 - mild to moderate; <i>Increased intestinal permeability based on change in potential difference in ST1, 3 and 4 symptomatic strains</i>	Subtype dependent variation in severity of intestinal damage and permeability - ST1 and 3 more severe than ST2 and 4	Absence of xenic culture associated microflora controls; No mention of prior screening for <i>Blastocystis</i> spp.
2008	Eida [74]	4 week old albino mice	Asymptomatic (ST2, ST3, ST4)/Xenic culture Human diarrhea/ST/culture	Oral: $4 \times 10^7$	NO estimation	Concentrations of Nitric Oxide in infected mice tissue, blood and stool higher than uninfected controls with highest levels seen in caecal tissue.	<i>Induction of NO in tissue with greater response in caecal tissue than ileum</i>	No specific detection methods for <i>Blastocystis</i> spp. in histology Absence of xenic culture associated microflora controls; No details on subtype
2008	Helmy [75]	4 week old albino mice	Human diarrhea/7/culture	Oral: $5 \times 10^6$	Histology	Pretreatment with antioxidants resulted in decreased pathology	Possible role of free radical damage in <i>Blastocystis</i> infection	Absence of xenic culture associated microflora controls; No details on subtype
2009	Santos [70]	6-8 week old BALB/c mice	ATCC50613/Mixed ST/Xenic	Oral: $5 \times 10^6$ ; Trophic stage	Blood and intestinal secretions from 1 to 8 weeks	Elevated serum IgM from week 1-5; In intestinal secretions IgA predominated with peak at 5 weeks.	Kinetics of Immunoglobulin response determined	Absence of xenic culture associated microflora controls
2009	Iguchi [45]	3 week old SPF Wistar male rats screened to be <i>Blastocystis</i> negative	RN 94-9/Brown Norway Rat/ST4/Cyst concentrated from rat feces	Oral: $10^5$	Caecal feces culture; histology; cytokine analysis; tight junctions	All infected rats positive from 1 to 4 weeks later; Intact mucosa, non-significant inflammatory infiltrates; <i>increase in neutral mucin containing goblet cells 2 weeks post infection; upregulation of IFN<math>\gamma</math>, IL-12 and TNF<math>\alpha</math> at 2-3 weeks post infection; no change in expression of occludin or ZO</i>	<i>First in vivo study demonstrating cytokine response with upregulation of IFN<math>\gamma</math>, IL-12 and TNF<math>\alpha</math></i>	Absence of xenic culture associated microflora controls

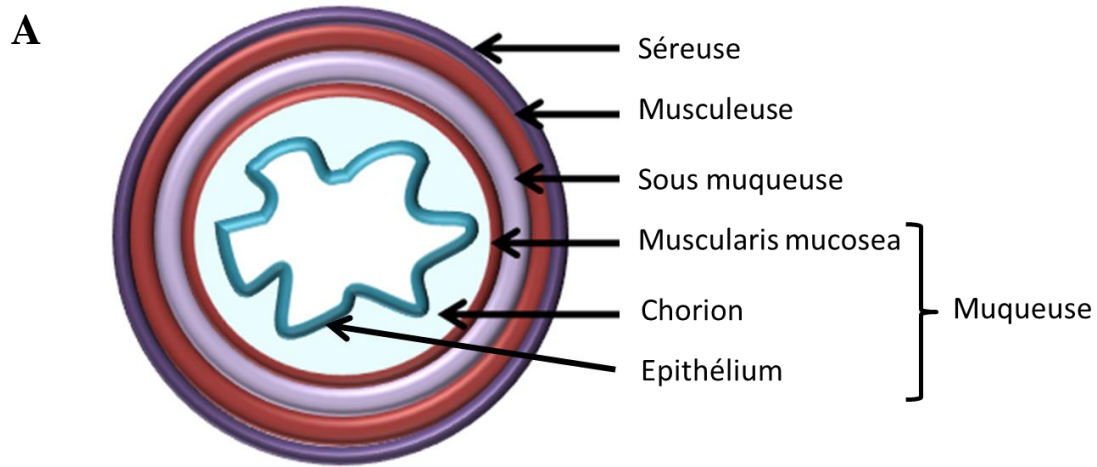
**Tableau A1 : Suite et fin**

Year	Author	Animal model	Parasite description	Route	Detection methods	Read outs	Relevant findings	Limitations
2010	Zhou [76]	6 week old female BALB/c mice	Human diarrhea/ST7/Xenic culture	Intra-peritoneal . 10 <sup>4-6</sup>	Abdominal contents	Granular and vacuolar forms seen in abdominal cavity and passaged to healthy mice		
2010	Elwakil [65]	4 week old albino mice	Human diarrhea/?ST/culture	Oral: 10 <sup>2-7</sup>	Fecal microscopy; Histology	Increased infectivity with inoculum, with 10 <sup>^7</sup> , lethargy, weight loss and mucus feces seen; Infiltrates into lamina propria and submucosal muscle layer; inflammatory infiltrates	Invasive potential	Absence of xenic culture associated microflora controls; No specific detection methods for Blastocystis spp. in histology
2010	Chandramathi [77]	4 week old Sprague Dawley Rats prescreened for Blastocystis	Human sample/cysts/?ST	Oral: 10 <sup>5</sup>	Feces microscopy, culture; Urine Hyaluronidase activity; Cytokines in serum	Positive from day 5 to Day 30; HA activity increased on day 28; IL6 and IL8 elevated compared to uninfected controls on day 30	Invasive and inflammatory potential	Absence of xenic culture associated microflora controls; No details on subtype
2010	Chandramathi [78]	4 week old Sprague Dawley Rats prescreened for Blastocystis	Human sample/purified cysts/?ST	Oral: 10 <sup>3</sup>	Feces	Positive from day 5 coincident with increase in oxidative indices to day 30	Potential oxidative damage induced by Blastocystis	No details on subtype
2013	Li [66]	6 week old SPF Sprague Dawley	Human Diarrhea/ST1/Xenic culture/Cyst concentration	Oral: 10 <sup>2-4</sup>	Fecal culture; Intestinal contents; Histology	All infected rats positive by day 10; Granular and vacuolar forms in caecum, cyst forms more common in distal colon; Mucosal adhesion, inflammatory infiltrates, mucosal sloughing and in high doses invasion to lamina propria	ST1 animal model with inflammation and invasive potential	Absence of xenic culture associated microflora controls; No mention of prior screening for Blastocystis spp.; No specific detection methods for Blastocystis spp. in histology
2014	Chandramathi [79]	3 week old Wistar albino Rats prescreened for Blastocystis	Human sample/purified cysts/?	Oral: 10 <sup>4</sup>	Oxidative damage	Increased cyst shedding, serum IgE and oxidative damage increased in mice with additional stress than mice with Blastocystis infection alone. Decreased PBMC proliferation.	Stress associated increase in pathogenicity of Blastocystis	No details on subtype. No other pathogen control

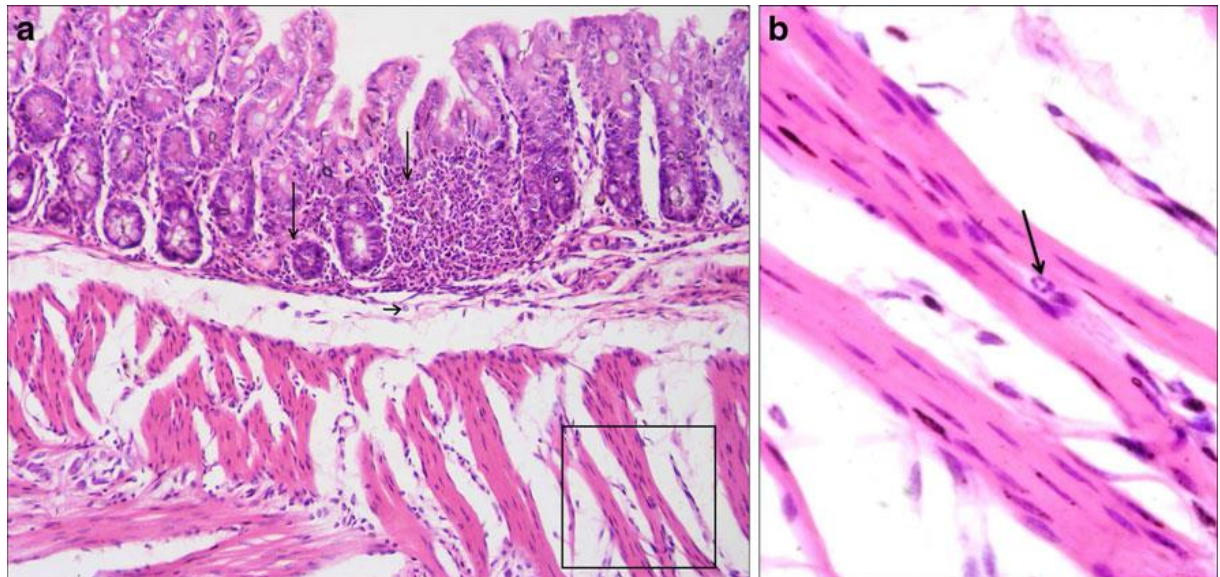


## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

expérimentales car *Blastocystis* sp. n'a encore jamais été identifié chez cet animal (Chen et al., 1997) suggérant ainsi que la souris ne serait pas un hôte naturel du parasite. Néanmoins, plusieurs infections expérimentales ont quand même été réalisées en utilisant des souris BALB/c ou Swiss et des isolats obtenus en général chez des patients symptomatiques (Moe et al., 1997, 1998 ; Santos et Rivera, 2009 ; Zhou et al., 2010 ; Elwakil et Hewedi, 2010 ; Pavanelli et al., 2015 ; Abdel Hafeez et al., 2015, 2016). Il est surprenant de noter que dans la majorité de ces études, les isolats de *Blastocystis* sp. n'ont même pas été sous-typés alors que c'est une information majeure dans le cadre de ces infections. Seuls Moe et al. (1998) ont décrit avoir utilisé une souche humaine de ST7 alors que Pavanelli et al. (2015) relatent, sans plus de détails, avoir infecté leurs animaux avec un « mélange d'isolats de ST1 et de ST3 ». Pour ces différentes infections expérimentales, plusieurs voies d'administration du parasite ont été utilisées : voie orale, injection intra-caecale, intra-péritonéale ou intra-musculaire. La susceptibilité à l'infection par *Blastocystis* sp. dépend largement de l'âge des animaux puisque les souris âgées de 8 semaines ou plus sont insensibles à l'infection (Moe et al., 1997). Un effet dose a aussi été mis en évidence puisqu'aucune souris inoculée par voie orale avec  $10^2$  parasites n'était infectée (Elwakil et Hewedi, 2010). Par contre, 40% des souris inoculées avec  $10^5$  parasites et 100% des souris inoculées avec  $4.10^7$  parasites étaient infectées par *Blastocystis* sp. Sur un plan clinique, certains animaux infectés pouvaient présenter une certaine léthargie et une perte de poids (Moe et al., 1998 ; Elwakil et Hewedi, 2010 ; Zhou et al., 2010). Au niveau histologique, il a été démontré que *Blastocystis* sp. était capable d'induire une inflammation, des œdèmes et une desquamation de l'épithélium du caecum et du côlon (Moe et al., 1997). De plus, la forme vacuolaire du parasite pouvait s'infiltrer au niveau du chorion et de la sous muqueuse des animaux montrant ainsi un potentiel invasif (**Figure A4**) (Elwakil et Hewedi, 2010). En outre, Zhou et al. (2010) ont montré que la forme kystique du parasite pouvait perdurer plus de 6 mois dans la cavité abdominale de souris infectées après injection intra-péritonéale du parasite. L'inoculation du parasite par voie intra-musculaire a aussi permis de mettre en évidence une réaction inflammatoire sévère et une nécrose des muscles (Moe et al., 1998). Plus récemment, des souris Balb/c immunocompétentes et immunodéprimées par ajout de dexaméthasone dans l'eau de boisson ont été infectées par un isolat de *Blastocystis* sp. issu d'une selle de patient atteint du SII (Abdel-Hafeez et al., 2016). Les examens histologiques réalisés ont mis en évidence une desquamation de la muqueuse de la partie terminale de l'iléon et une infiltration du parasite dans les entérocytes chez les souris immunodéprimées. La présence d'œdèmes au niveau du chorion et de congestions sévères du caecum et du côlon a aussi été observée chez ces mêmes



**B**

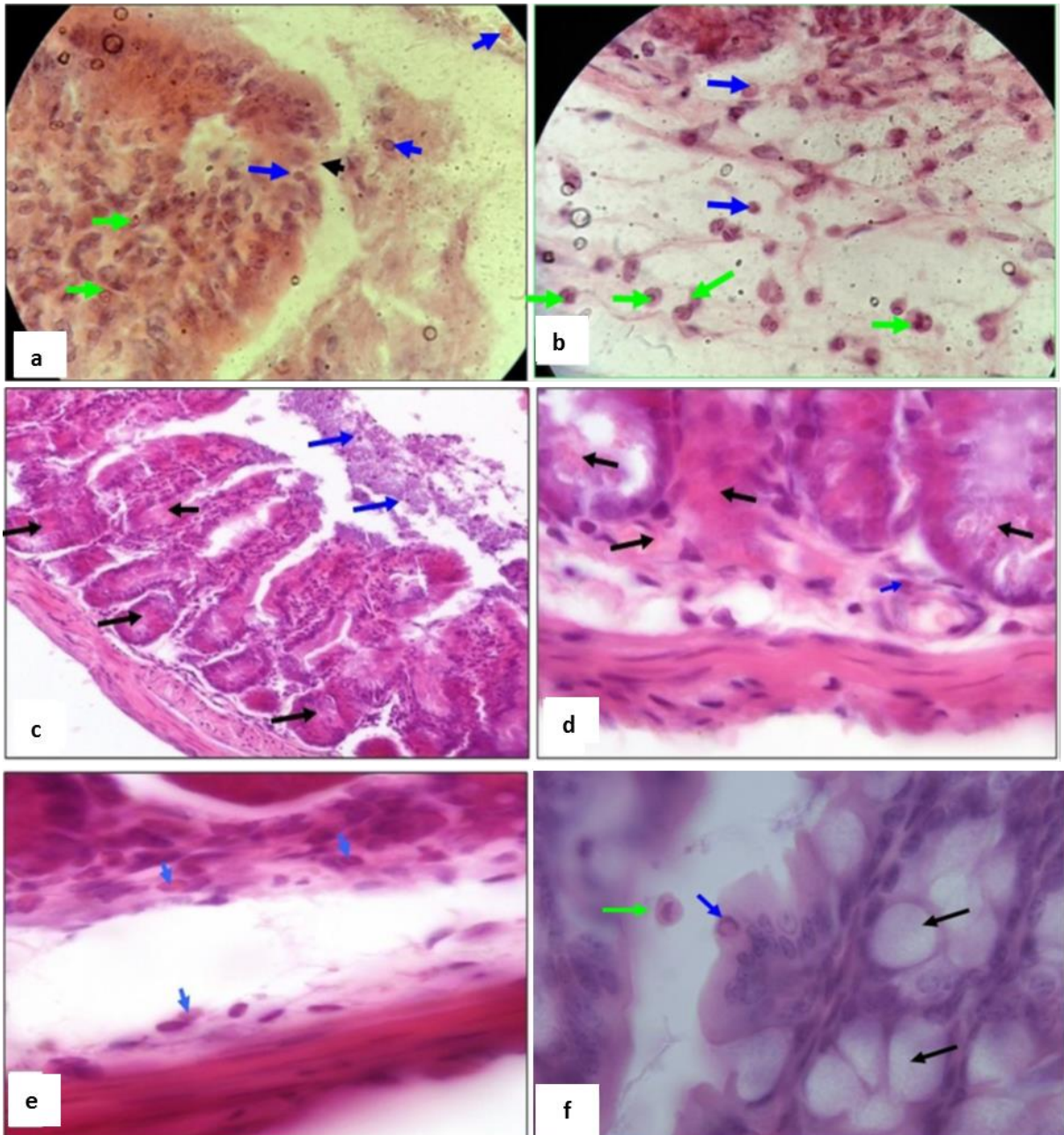


**Figure A4:** Représentation schématique en coupe transversale des différentes couches composant le tube digestif (**A**). Section histologique du côlon de souris infectées après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (**B**). On peut observer des formes vacuolaires de *Blastocystis* sp. dans le chorion (flèches) mais également dans la muqueuse, la sous muqueuse et la musculeuse (encadré) x 200 (**a**). Agrandissement de l'encadré à x 400 (**b**) (Elwakil et Hewedi, 2010).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

souris. Des observations similaires ont été faites chez les souris immunocompétentes mais à un moindre degré. Dans cette même étude, une hyperplasie des cellules caliciformes (glande unicellulaire sécrétant et contenant la mucine) a également été observée chez les souris immunodéprimées (**Figure A5**). Dernièrement, Ajjampur et al. (2016) ont testé le pouvoir d'adhésion de deux isolats de ST7 (ST7 isolat B et ST7 isolat H) d'origine humaine sur des explants entériques de souris C57/BL6 (modèle *ex vivo*). Ces deux isolats montrent un pouvoir d'adhésion différent et le plus adhérent (ST7 isolat H) se fixe préférentiellement au côlon plutôt qu'au caecum et à l'iléon terminal. Par contre, les deux isolats sont capables de se fixer sur la mucine de tous les segments du gros intestin et de la dégrader ce qui pourrait faciliter la pénétration de la muqueuse intestinale par le parasite. *In vivo*, ces deux isolats n'infectent pas ces souris après inoculation par voie intra-caecale. Par contre, dans un modèle de colite expérimentale induite chez ces souris par le sodium sulfate de dextran (DSS), les deux souches de *Blastocystis* sp. inoculées par voie intra-caecale causent rapidement une diarrhée aigüe chez les animaux qui est absente dans la population animale contrôle ainsi que des altérations histologiques en particulier au niveau du côlon (perturbation de l'architecture des cryptes intestinales, infiltration de cellules inflammatoires dans le chorion, perte de cellules caliciformes...). Ces altérations sont plus importantes pour l'isolat H que pour l'isolat B. En outre, au regard de leurs différentes expérimentations, les auteurs ne confirment pas le caractère invasif du parasite qui reste plutôt dans la lumière intestinale ou associé à la mucine ce qui est en accord avec la plupart des études précédentes menées chez la souris.

Contrairement à la souris, le rat est un hôte naturel du parasite (Alfellani et al., 2013a). Ainsi, des rats Wistar de 4 semaines ont pu être infectés par voie orale par la forme kystique d'un isolat issu de selles humaines (Suresh et al., 1993). Au bout de 7 jours, le parasite était présent en grand nombre au niveau du caecum et du côlon. Une autre étude portant également sur des rats Wistar infectés par voie orale par la forme kystique d'isolats de ST4 avait montré qu'une des souches testées pouvait entraîner une infection chronique chez l'animal (Yoshikawa et al., 2004). Dans cette même étude, les auteurs ont également confirmé que le mode principal de transmission du parasite était bien la voie féco-orale en induisant l'infection de rats sains par simple contact direct avec des rats infectés. Des infections expérimentales ont aussi été réalisées avec succès en inoculant aux rats des isolats de ST4 et de ST6 d'origine humaine (Iguchi et al., 2007) confirmant ainsi de nouveau la faible spécificité d'hôte du parasite. Un peu plus tard, une autre étude portant sur des rats Wistar visait à identifier le pouvoir infectieux de différents isolats issus de selles de patients symptomatiques ou asymptomatiques et appartenant aux ST1, ST3 et ST4 (Hussein et al.,



**Figure A5:** Sections histologiques de l'iléon de souris immunodéprimées infectées après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (x 100) (**a ; b**). Observation de nombreux *Blastocystis* sp. dans la lumière intestinale (flèches bleues) et d'une desquamation de la muqueuse épithéliale (flèche noire) (**a**). Présence de *Blastocystis* sp. dans le chorion et dans la sous-muqueuse (flèches bleues) et (**b**) présence de nombreux éosinophiles (flèches vertes). (**c-f**). Sections histologiques du côlon de souris immunodéprimées infectées après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (x 100). (**c**). Observation d'œdèmes et de congestion des vaisseaux sanguins. (**d, f**). Présence de *Blastocystis* sp. dans le chorion (flèches bleues) et (**e**) dans la muscularis mucosae (flèches bleues). (**f**) Observation d'une hyperplasie des cellules caliciformes. (Abdel-Hafeez et al., 2016).

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2008). Seuls les rats infectés par des isolats issus de patients symptomatiques montraient des changements pathologiques classés de modérés à sévères et un isolat de ST1 entraînait même la mort d'une proportion significative d'animaux (25%). Peu après, Iguchi et al. (2009) ont réussi à induire une infection chronique par *Blastocystis* sp. chez des rats Wistar après inoculation par voie orale d'un isolat de ST4. Cependant, les animaux ne montraient pas de perte de poids et de diarrhée ni d'altération histologique au niveau du caecum. Par contre, les auteurs observaient une diminution significative du nombre de cellules caliciformes dans le caecum des animaux infectés. Enfin, une dernière étude menée en 2013 sur des rats Sprague Dawley a permis de mettre en évidence que quelque soit la dose de parasites de ST1 d'origine humaine inoculés par voie orale, les animaux infectés présentaient tous une certaine léthargie après l'infection mais sans perte de poids ou diarrhée (Li et al., 2013). De plus, tous les rats infectés présentaient au niveau histologique une infiltration de cellules inflammatoires dans la muqueuse intestinale. Des oedèmes et une érosion de cette muqueuse ont aussi été observés chez certains rats ainsi qu'une invasion du chorion.

## RESULTATS

### 1. Epidémiologie moléculaire de *Blastocystis* sp. dans la population humaine et identification de facteurs de risque de transmission du parasite

#### I. Enquêtes épidémiologiques au Liban

##### A) Dans la population générale

*Préambule* : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal « *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* ».

##### a. Introduction

Le Liban est un pays très touché par les infections parasitaires puisqu'une étude menée en 2004 dans le nord de ce pays montrait une prévalence de l'ordre de 33% des infections parasitaires intestinales dans la population analysée (Hamze et al., 2004). Cependant, dans cette enquête, certains protozoaires comme *Blastocystis* sp. n'avaient pas été recherchés alors que ce dernier parasite est très fréquent à travers le monde. En outre, très peu de données moléculaires concernant *Blastocystis* sp. étaient globalement disponibles pour le Moyen-Orient. Il était donc intéressant de mener la première enquête épidémiologique concernant ce parasite au Liban. Dans le cadre de cette étude, les selles de 220 patients libanais présentant ou non des symptômes digestifs et suivis dans 6 hôpitaux de la région de Tripoli au Nord-Liban ont été collectées. En parallèle, un questionnaire a été complété pour chaque patient (**Annexe II**) afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques permettant d'établir une éventuelle corrélation entre les STs de *Blastocystis* sp. et la présence de troubles digestifs.

##### b. Résultats

El Safadi D., Meloni D., Poirier P., Osman M., **Cian A.**, Gaayeb L., Wawrzyniack I., Delbac F., El Alaoui H., Delhaes L., Dei-Cas E., Mallat H., Dabboussi F., Hamze M., Viscogliosi E. (2013). Molecular Epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and Correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg.* 88:1203–1206

# RESULTATS

## c. Conclusion

Cette étude nous a permis d'obtenir ce qui est à notre connaissance les premières données d'épidémiologie moléculaire concernant *Blastocystis* sp. au Liban. La prévalence du parasite dans cette cohorte de patients vivant au Nord-Liban était de 19%. Des enquêtes menées dans des pays voisins comme en Iran (Moosavi et al., 2012) montraient des prévalences de *Blastocystis* sp. assez similaires. Néanmoins, il est probable que la prévalence du parasite ait été sous-estimée dans notre enquête. En effet, la méthode de détection utilisée fut l'observation microscopique directe des selles qui est connue pour être moins sensible que les méthodes moléculaires (Poirier et al., 2011). Un sous-typage des échantillons positifs en microscopie a été réalisé et montrait que la distribution des STs dans la population libanaise était semblable à celle observée dans les pays du pourtour méditerranéen et plus globalement dans une majorité de pays à travers le monde (Alfellani et al., 2013b; Stensvold et Clark, 2016). Dans notre cohorte, le ST3 était prédominant suivi des ST1 et ST2 puis du ST4. Ce dernier ST est rarement trouvé en dehors du continent européen et nos données confirmaient cette observation. Enfin, l'analyse statistique des données cliniques recueillies auprès des patients a permis d'établir une corrélation entre le ST1 de *Blastocystis* sp. et la présence de troubles digestifs.

### **Ma contribution dans cette étude :**

- ✓ Gestion des échantillons
- ✓ Enregistrement des données cliniques pour les analyses statistiques
- ✓ Génotypage d'isolats
- ✓ Lecture et correction du manuscrit

## RESULTATS

### **Article 2: Short report: Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms**

**Dima El Safadi, Dionigia Meloni, Philippe Poirier, Marwan Osman, Amandine Cian, Lobna Gaayeb, Ivan Wawrzyniack, Frederic Delbac, Hicham El Alaoui, Laurence Delhaes, Eduardo Dei-Cas, Hassan Mallat, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze, and Eric Viscogliosi\***

Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Lille, France; Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Laboratoire Microbiologie, Santé et Environnement, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon; Department of Biomedical Sciences, Division of Experimental and Clinical Microbiology, University of Sassari, Sassari, Italy; Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, CNRS UMR 6023, Clermont Université, Université Blaise Pascal, Aubière, France

\* Address correspondence to Eric Viscogliosi, Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, EA4547, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France. E-mail : eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

**Abstract:** *Blastocystis* is the most common eukaryotic parasite in the intestinal tract of humans. Due to its potential impact in public health, we acquired the first data concerning the prevalence of this parasite and the frequency of the *Blastocystis* subtypes (STs) in the Lebanese population. In this study, fecal samples from 220 Lebanese symptomatic and asymptomatic patients were collected and a total of 42 patients (19%) were identified as positive for this parasite by direct-light microscopy of smears. Among these, 36 *Blastocystis* isolates were genotyped using partial small subunit ribosomal RNA gene sequencing. ST distribution in the present Lebanese population was as follows: ST3 (33.3%), ST2 (33.3%), ST1 (30.6%) and ST4 (2.8%). These data were compared to those available in other Middle Eastern and neighboring countries. Finally, ST1 was significantly more prevalent among symptomatic patients of this Lebanese population.



## RESULTATS

*Blastocystis* is the most common intestinal parasite of humans and a wide range of animals with a worldwide distribution.<sup>1</sup> Its prevalence can reach 30% to 60% in developing countries and 1.5% to 20% in industrialized countries.<sup>1</sup> Even if the clinical significance of this parasite remains controversial, *Blastocystis* has been correlated with various gastrointestinal symptoms. It may also play a significant role in irritable bowel syndrome (IBS) and has been linked with urticaria.<sup>2-6</sup> According to recent *in vivo* and *in vitro* studies as well as genomic data, a model for pathogenesis of this parasite was proposed, mainly involving cysteine proteases secreted by the parasite.<sup>5-7</sup> *Blastocystis* organisms found in different hosts are morphologically indistinguishable. However, this genus exhibits an extensive genetic diversity and at least 13 subtypes (STs) have been described on the basis of molecular data<sup>8-10</sup>, which showed sufficient genetic divergence to be classified as separate species.<sup>11</sup> Moreover, nine of these STs (ST1-ST9) have been isolated from human fecal samples highlighting both the low host specificity of the parasite and its zoonotic potential.<sup>9-11</sup> In the recent literature it is still in debate whether distinct *Blastocystis* STs correlate with the development of gastrointestinal symptoms caused by the parasite.<sup>1,4,5,12,13</sup> Moreover, information on the distribution of STs in some geographic locations including Middle Eastern countries is only starting to emerge. Therefore, the aim of the present study was to acquire the first epidemiological data regarding the prevalence of *Blastocystis* in the Lebanese population together with the frequency of STs in symptomatic and asymptomatic patients.

To conduct this study, fecal specimens were randomly collected at six hospitals in North Lebanon (Nini Hospital, Governmental Hospital of Tripoli, Tripoli Center for Medical Analysis, Hamidi Medical Center, Monla Hospital and Saydet Zgharta Hospital) from 220 patients living in or in the vicinity of Tripoli during the period of March-April 2011. These patients were followed up for different pathologies such as gastrointestinal symptoms or presented for routine medical checkups. Stool samples were subsequently examined by direct-light microscopy of smears (DLM) for the presence of *Blastocystis* at the Centre AZM of Tripoli. No information was available on potential viral or bacterial infections. Genomic DNA was directly extracted from fecal samples positive for *Blastocystis* by DLM using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Each sample was amplified by non-quantitative PCR (non-qPCR) as previously described using two independent pairs of *Blastocystis*-specific primers<sup>14,15</sup>, both targeting the small subunit (SSU) rDNA coding region. The respective 600 bp and 520 bp-amplified domains have been shown to provide sufficient sequence information to discriminate between *Blastocystis* STs.<sup>14,15</sup> For each DNA sample,

## RESULTATS

the non-qPCR product with the highest intensity on agarose gel was purified and cloned as previously described.<sup>16</sup> Two clones containing inserts of approximately the expected size were arbitrarily selected for each sample and sequenced. DNA samples negative by non-qPCR were subsequently amplified using the highly sensitive real-time quantitative PCR (qPCR) assay developed by Poirier and others.<sup>17</sup> The expected 320 bp-amplified variable region of the SSU rRNA gene was directly sequenced for subtyping. To compare the subtyping data obtained by molecular methods, 7 DNA samples were amplified by both non-qPCR and qPCR methods. The SSU rRNA gene sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers KC294143 to KC294196. These new sequences were aligned with the use of the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu:BioEdit/bioedit.html>) then compared with all the *Blastocystis* SSU rRNA gene sequences available from the NCBI using the BLAST program. Subtypes were identified by determining the closest similarity against all known *Blastocystis* STs according to the last classification by Stensvold and others.<sup>8</sup>

A total of 42 patients (19%) were positive for *Blastocystis* by DLM. This high prevalence was in the same range as those observed in other neighboring countries such as Egypt and Iran.<sup>18,19</sup> It could roughly reflect the overall carriage rate of the parasite in the Lebanese population because most patients included in the present study were followed up for various pathologies other than intestinal or were asymptomatic. However, the prevalence of *Blastocystis* in our Lebanese population was more likely underestimated since several authors<sup>15,17</sup> pointed out the poor sensitivity of DLM compared to either non-qPCR or qPCR assays. This strongly suggested that the actual prevalence of *Blastocystis* in Lebanon might be much higher making this parasite a potential major problem in public health.

Among the 42 positive samples by DLM, 6 were unsuccessfully amplified by either non-qPCR or qPCR due probably to the presence of known PCR inhibitors in fecal samples. The remaining 36 isolates were collected from 15 females and 21 males, ranging in age from 1 to 83 years (**Table 1**). The symptomatic group consisted of 19 patients presenting variously with diarrhea, abdominal pain, vomiting, constipation, some in association with fatigue and fever. As previously reported<sup>1,5</sup>, abdominal pain and diarrhea were the two major symptoms among *Blastocystis*-positive Lebanese patients. The asymptomatic group was comprised of 17 individuals without any gastrointestinal symptoms. Each of the SSU rDNA gene sequences obtained from the 36 isolates showed 98% to 100% identity to representative sequences of *Blastocystis* STs reported so far, allowing the direct subtyping of these isolates (**Table 1**). For

## RESULTATS

8 of the 19 positive samples for which a 600 bp or 520 bp- fragment of the SSU rRNA gene was cloned, the two sequenced clones were identical (**Table 1**). Clones showed one to four nucleotide differences for 10 of the remaining samples that could be explained by sequence variations between SSU rDNA gene copies within the same isolate.<sup>7,16,20</sup> For the last sample DS25 (ST3), there were 10 nucleotide differences between both clones suggesting a possible coinfection of the patient with two variants within the same ST. In this regard, substantial intra-ST diversity has been recently demonstrated in ST3.<sup>20</sup> The 7 samples amplified by non-qPCR and qPCR yielded identical subtyping results.

All the 36 samples genotyped in this study represented single infections. As shown in Table 1, ST3 (33.3%) and ST2 (33.3%) were the most common in our Lebanese population followed by ST1 (30.6%) and ST4 (2.8%). In most countries around the world, a majority of human *Blastocystis* infections were attributable to ST3 isolates.<sup>16</sup> This was also the case in the Lebanese population even if the frequencies of ST1 and ST2 were identical or roughly similar to that of ST3. The ST distribution in Lebanon can now be compared to those of other Middle Eastern countries such as Iran<sup>19</sup> and to neighboring countries like Turkey<sup>21,22</sup> and Egypt.<sup>23,24</sup> In these countries, ST1 was the second most common variant after ST3 while it follows at third position in Lebanon but still has a high frequency. ST2 was globally poorly represented in Iran and Egypt whereas it was commonly found in Turkey and Lebanon. In addition, in our Lebanese population only 1/36 isolates has been genotyped as ST4. This ST has not been found in Egypt and Iran and was only identified in a single patient in Turkey. Overall ST4 is common in Europe<sup>25</sup> and much less frequent or absent in other geographical regions. In summary, our data showed a prevalence of ST1, ST2, and ST3 and a virtual absence of ST4 in the Middle Eastern and neighboring countries as well as some geographic variation in the frequency of ST2 that might reflect different exposure to animal and/or environmental infection sources.

To evaluate the pathogenic potential of the different *Blastocystis* STs in our Lebanese population, the phylogenetic distribution of the 36 genotyped isolates from symptomatic and asymptomatic individuals was examined. ST3 (8 of 12 isolates) and ST2 (7/12) were dominant in the asymptomatic group reinforcing the hypothesis that most isolates of these subtypes are likely to be non pathogenic.<sup>5</sup> The single ST4 isolate of our study was asymptomatic while ST4 has been shown to be common in patients with acute diarrhea.<sup>26</sup> Strikingly 10/11 ST1 isolates composed the symptomatic group and a statistical analysis done with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) using the Fisher's

## RESULTATS

exact test showed a significant association between ST1 and gastrointestinal symptoms ( $p=0.0113$ ). Recently, epidemiological surveys have reported the frequency of STs from symptomatic and asymptomatic individuals in China,<sup>27</sup> Turkey,<sup>28</sup> and Iran<sup>19</sup> and showed that ST1 was over-represented in groups of symptomatic patients. Moreover ST1 was the most prevalent ST of *Blastocystis* in patients with IBS<sup>24,29</sup> and human ST1 isolates were associated with elevated pathogenicity in experimentally infected rats.<sup>30</sup> However, patient symptomatic status was uncorrelated with *Blastocystis* ST and symptoms in the context of several other epidemiological studies.<sup>16,21,31,32</sup>

To our knowledge this is the first investigation of prevalence and molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon. In this country, the prevalence of this parasite would be high with predominance of ST3, ST2 and ST1 isolates. A consistent link between ST1 and gastrointestinal symptoms was identified and should be confirmed in further studies including a larger number of patients.

**Acknowledgments :** This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques from the University of Lille 2, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Institut Pasteur of Lille. DES and MO were both supported by PhD fellowships from the Conseil National de la Recherche Scientifique and the Azm & Saade Association from Lebanon, and DM by a PhD fellowship from the Regione Autonoma della Sardegna.

## REFERENCES

1. Tan KSW, 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 21: 639-665.
2. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS, 2008. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors* 1: 40.
3. Katsarou-Katsari A, Vassalos CM, Tzanetou K, Spanakos G, Papadopoulou C, Vakalis N, 2008. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm Venereol* 88: 80-81.
4. Stensvold CR, Nielsen HV, Molbak K, Smith HV, 2009. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 25: 23-29.
5. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA, 2010. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep* 12: 28-35.

## RESULTATS

6. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H, 2012. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog* 8: e1002545.
7. Denoëud F, Roussel M, Noël B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armamet C, Couloux A, Poulain J, Segurans B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KSW, Antigenave F, Jaillon O, Aury J, Delbac F, Wincker P, Vivarès CP, El Alaoui H, 2011. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* 12: R29.
8. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG, 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. *Trends Parasitol* 23: 93-96.
9. Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG, 2009. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol* 39: 473-479.
10. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC, 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol* 169: 8-17.
11. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E, 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* 43: 348-355.
12. Scanlan PD, 2012. *Blastocystis*: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol* 28: 327-334.
13. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K, 2009. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 137: 1655-1663.
14. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG, 2006. DNA barcoding of *blastocystis*. *Protist* 157: 77-85.
15. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV, 2007. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 303-307.

## RESULTATS

16. Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E, 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* 105: 413-421.
17. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V, 2011. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with haematological malignancies. *J Clin Microbiol* 49: 975-983.
18. Rayan HL, Ismail OA, El Gayar EK, 2007. Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasite infection. *J Egypt Soc Parasitol* 37: 599-608.
19. Moosavi A, Haghghi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, Zali MR, 2012. Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-012-3085-5.
20. Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noël C, Gantois N, Wawrzyniak I, Delbac F, Chabé M, Delhaes L, Dei-Cas E, Fiori PL, El Alaoui H, Viscogliosi E, 2012. Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol Int* 61: 719-722.
21. Dogruman-Al F, Yoshikawa H, Kustimur S, Balaban N, 2009. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic individuals in a major hospital in Ankara. *Parasitol Res* 106: 263-268.
22. Eroglu F, Koltas IS, 2010. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitol. Res.* 107: 841-845.
23. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E, 2010. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* 106: 505-511.
24. Fouad SA, Basyoni MM, Fahmy RA, Kobaisi MH, 2011. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab J Gastroenterol* 12: 194-200.
25. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark GC, Evengard B, 2012. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 1689-1696.
26. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV, 2011. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 84: 883-885.

## RESULTATS

27. Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G, 2006. Genetic variability of *Blastocystis* isolates in China. *Parasitol Res* 99: 597-601.
28. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS, 2009. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res* 105: 1589-1592.
29. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R, 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 106: 1033-1038.
30. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM, 2008. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* 102: 853-860.
31. Özyurt M, Kurt Ö, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR, 2008. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey. *Parasitol Int* 57: 300-306.
32. Jantermtor S, Pinlaor P, Sawadpanich K, Pinlaor S, Sangka A, Wilailuckana C, Wongsena W, Yoshikawa H, 2012. Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitol Res* Dec 9. [Epub ahead of print]

# RESULTATS

TABLE 1

Clinical data and *Blastocystis* subtypes among symptomatic and asymptomatic patients in Lebanon

Patients	Sex/age	Symptoms	<i>Blastocystis</i> ST by non-qPCR*	Nucleotide differences†	<i>Blastocystis</i> ST by qPCR*¶	Accession no.¶
DS1	M/71	Diarrhea			1	KC294143¶
DS2	M/65				3	KC294144¶
DS3	F/10	Abdominal pain Vomiting¶			2	KC294145¶
DS4	M/4	Diarrhea Vomiting¶ Fever¶			1	KC294146¶
DS5	M/69	Diarrhea Abdominal pain¶			1	KC294147¶
DS6	M/33				2	KC294148¶
DS7	M/44				1	KC294149¶
DS8	M/21	Diarrhea Abdominal pain¶ Vomiting¶			1	KC294150¶
DS9	M/12	Diarrhea Vomiting¶ Fever¶	2 (Sc)	4	2	KC294151-3¶
DS10	M/13	Diarrhea Abdominal pain¶ Fever¶ Fatigue¶	1 (Sc)	2	1	KC294154-6¶
DS11	F/27	Diarrhea	2 (Sc)	0		KC294157¶
DS12	F/23		3 (Sc)	0	3	KC294158-9¶
DS13	M/60		3 (Sc)	0	3	KC294160-1¶
DS14	F/30	Abdominal pain	3 (Sc)	0	3	KC294162-3¶
DS15	M/34	Abdominal pain			3	KC294164¶
DS16	M/40				2	KC294165¶
DS15	M/34	Abdominal pain			3	KC294164¶
DS16	M/40				2	KC294165¶
DS17	M/29	Diarrhea Abdominal pain¶			1	KC294166¶
DS18	F/6				2	KC294167¶
DS19	F/31	Abdominal pain	2 (Sc)	0		KC294168¶
DS20	F/5		3 (St)	1		KC294169-70¶
DS21	M/51				2	KC294171¶
DS22	F/83				2	KC294172¶
DS23	F/20	Abdominal pain Fatigue¶ Constipation¶	1 (St)	3	1	KC294173-5¶
DS24	M/3	Diarrhea Abdominal pain¶ Vomiting¶			1	KC294176¶
DS25	M/24		3 (Sc)	10		KC294177-8¶
DS26	F/11	Diarrhea Abdominal pain¶	3 (Sc)	1		KC294179-80¶
DS27	F/5	Abdominal pain Vomiting¶ Fatigue¶	1 (St)	1		KC294181-82¶
DS28	F/8		4 (Sc)	0		KC294183¶
DS29	M/8		2 (Sc)	0		KC294184¶
DS30	M/5	Abdominal pain			2	KC294185¶
DS31	M/16	Abdominal pain	1 (Sc)	2		KC294186-7¶
DS32	F/23		3 (St)	1		KC294188-9¶
DS33	F/22				2	KC294190¶
DS34	F/40		3 (Sc)	2		KC294191-2¶
DS35	M/35		3 (St)	0		KC294193¶
DS36	M/1	Diarrhea Abdominal pain¶	3 (St)	2	3	KC294194-6¶

\*According to the new standard terminology<sup>8</sup>; (St) and (Sc): non-qPCR using the primer pair described by Stensvold and others<sup>15</sup> and Scicluna and others<sup>14</sup>, respectively

†Determined in the common region of two clones sequenced for each sample



# RESULTATS

## B) Dans une population d'écoliers au Liban

*Préambule : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal « PLoS Neglected Tropical Diseases ».*

### a. Introduction

Les parasitoses intestinales sont les infections les plus fréquentes dans les pays en voie de développement et touchent tout particulièrement les enfants qui représentent une population très vulnérable. Cependant, aucune donnée n'était disponible concernant la prévalence et les facteurs de risque de transmission de ces parasitoses chez les enfants au Liban. Aussi les parasites intestinaux *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Dientamoeba* et *Giardia* ont été recherchés dans les selles de 249 écoliers âgés de 3 à 16 ans et scolarisés dans deux écoles de statut socio-économique différent de Tripoli au Nord-Liban. Un examen microscopique des selles à l'état frais suivi ou non d'une coloration a d'abord permis d'établir la prévalence des différents parasites intestinaux présents. En parallèle, une identification moléculaire de *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* et *Dientamoeba* a été réalisée à partir de l'ensemble des selles testées. Pour chaque écolier, un questionnaire standard (**Annexe III**) a été complété par les parents ou les tuteurs légaux afin de collecter différents types de données. L'analyse statistique de ces données avait pour but d'identifier d'éventuels facteurs de risque de transmission de ces parasites.

### b. Résultats

**Cian A.\***, Osman M.\*, El Safadi D.\*, Benamrouz S., Nourisson C., Poirier P., Pereira B., Razakandrainibe R., Pinon A., Lambert C., Wawrzyniak I., Dabboussi F., Delbac F., Favennec L., Hamze M., Viscogliosi E., Certad G. (2016). Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(4): e0004643

**\*Co-premiers auteurs**

### c. Conclusion

Cette étude apporte, à notre connaissance, les premières données moléculaires concernant la prévalence des parasites intestinaux *Blastocystis*, *Dientamoeba*, *Cryptosporidium* et *Giardia* chez les enfants au Liban. Les résultats obtenus montrent que

## RESULTATS

85% (212/249) des écoliers de notre cohorte étaient infectés par au moins un parasite. Les parasites intestinaux les plus fréquemment retrouvés étaient *Blastocystis* sp. (63%) et *Dientamoeba fragilis* (60,6%) alors que la prévalence de *Cryptosporidium* spp. atteignait quand même 10,4% et celle de *Giardia duodenalis* 28,5%. Si on se focalise sur les 157 échantillons positifs à *Blastocystis* sp., 138 présentaient une mono-infection et 3 STs ont été identifiés avec une nette prédominance du ST3 (46,3%) suivi du ST2 (28,3%) et du ST1 (25,4%). Ces résultats montraient, comme l'étude précédente menée dans la population générale au Liban (**Article 2**), l'absence ou la quasi-absence du ST4 dans cette région du globe. Pour ce qui est de *Cryptosporidium* spp., 26 échantillons étaient positifs pour ce parasite avec 77% d'entre eux identifiés comme étant *C. hominis* et 23% comme *C. parvum*. La prédominance de *C. hominis* dans la population libanaise a déjà été mise en évidence lors d'une étude antérieure menée dans l'équipe et portant sur des patients hospitalisés dans la même région (Osman et al., 2015). En ce qui concerne *G. duodenalis*, 67 des 71 échantillons positifs ont pu être génotypés. Ainsi 64 échantillons appartenaient à l'assemblage B, 2 échantillons appartenaient à l'assemblage A et un échantillon présentait une infection mixte. Les analyses statistiques réalisées ont permis de mettre en évidence des facteurs de risque de transmission souvent spécifiques à un seul parasite. Seul le « contact avec des personnes vivant sous le même toit et ayant des symptômes gastro-intestinaux » est un facteur de risque de transmission partagé par 3 des 4 parasites intestinaux étudiés. Les prévalences observées pour ces parasites chez les enfants au Liban sont très importantes et nécessitent donc de prendre au plus vite des mesures de prévention de ces parasitoses.

### **Ma contribution dans cette étude :**

- ✓ Participation à la mise en place de l'étude
- ✓ Gestion des échantillons
- ✓ Enregistrement des données pour les analyses statistiques
- ✓ Génotypage des isolats de *Blastocystis* sp. et de *Giardia* spp. et analyse des données de séquençage
- ✓ Participation à la rédaction de l'article

## RESULTATS

### **Article 3: Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon**

**Marwan Osman<sup>1,2,3,†</sup>, Dima El Safadi<sup>1,2,3,†</sup>, Amandine Cian<sup>1, †</sup>, Sadia Benamrouz<sup>1,4</sup>, Céline Nourrisson<sup>5,6</sup>, Philippe Poirier<sup>5,6</sup>, Bruno Pereira<sup>7</sup>, Romy Razakandrainibe<sup>8</sup>, Anthony Pinon<sup>9</sup>, Céline Lambert<sup>7</sup>, Ivan Wawrzyniak<sup>5</sup>, Fouad Dabboussi<sup>2,3</sup>, Frederic Delbac<sup>5</sup>, Loïc Favennec<sup>8</sup>, Monzer Hamze<sup>2,3</sup>, Eric Viscogliosi<sup>1</sup>, Gabriela Certad<sup>1,10\*</sup>**

<sup>1</sup> Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), UMR CNRS 8204, Inserm U1019, Université de Lille, Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE), Lille, France

<sup>2</sup> Centre AZM pour la recherche en biotechnologies et ses applications, Université Libanaise, Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Tripoli, Lebanon

<sup>3</sup> Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Beirut, Lebanon

<sup>4</sup> Faculté Libre des Sciences et Technologies de Lille, Université Catholique de Lille, Université de Lille, Laboratoire Ecologie et Biodiversité, Lille, France

<sup>5</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal-Université d'Auvergne-CNRS, UMR 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France

<sup>6</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire Gabriel-Montpied, Clermont-Ferrand, France

<sup>7</sup> CHU Clermont-Ferrand, Unité de Biostatistiques, Direction de la Recherche Clinique, Clermont-Ferrand, France

<sup>8</sup> EA 3800, Université de Rouen & Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, Rouen, France

<sup>9</sup> Institute Pasteur de Lille, Unité de Sécurité Microbiologique, Lille, France

<sup>10</sup> Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille. Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, France

† Equal contributors

\* gabriela.certad@pasteur-lille.fr

# RESULTATS

## Abstract

**Background:** Intestinal protozoan infections are confirmed as major causes of diarrhea, particularly in children, and represent a significant but often neglected threat to public health. No recent data was available in Lebanon concerning the molecular epidemiology of protozoan infections in children, a vulnerable population at high risk of infection.

**Methodology and Principal Findings:** In order to improve our understanding of the epidemiology of intestinal pathogenic protozoa, a cross-sectional study was conducted in a general pediatric population including both symptomatic and asymptomatic subjects. After obtaining informed consent from the parents or legal guardians, stool samples were collected in January 2013 from 249 children in 2 schools in Tripoli, Lebanon. Information obtained from a standard questionnaire included demographic characteristics, current symptoms, socioeconomic status, source of drinking water, and personal hygiene habits. After fecal examination by both microscopy and molecular tools, the overall prevalence of parasitic infections was recorded as 85%. *Blastocystis* spp. presented the highest infection rate (63%), followed by *Dientamoeba fragilis* (60.6%), *Giardia duodenalis* (28.5%) and *Cryptosporidium* spp. (10.4%). PCR was also performed to identify species and genotypes of *Cryptosporidium*, subtypes of *Blastocystis*, and assemblages of *Giardia*. Statistical analysis using a logistic regression model showed that contact with family members presenting gastrointestinal disorders was the primary risk factor for transmission of these protozoa.

**Conclusions:** This is the first study performed in Lebanon reporting the prevalence, and the clinical, and molecular epidemiological data associated with intestinal protozoan infections among schoolchildren in Tripoli. A high prevalence of protozoan parasites was found, with *Blastocystis* spp. being the most predominant protozoans. Although only 50% of children reported digestive symptoms, asymptomatic infection was observed, and these children may act as unidentified carriers. This survey provides necessary information for designing prevention and control strategies to reduce the burden of these protozoan infections, especially in children.

## Summary

Intestinal parasites can infect the gastrointestinal tract of humans. Means of exposure include ingestion of contaminated fruits and vegetables, consumption of infected water and personal contact. Protozoa are considered one of the major groups of parasites. Children are particularly susceptible to infection by these microorganisms, and when they are infected, diarrhea can be the main clinical manifestation. In developing countries, people are at particular risk of infection. However, intestinal parasites, and in particular protozoans, have

## RESULTATS

been taken into account only in a few epidemiological studies. Thus, we conducted an investigation to determine the prevalence, risk factors, and epidemiological information associated with 4 intestinal protozoan infections: *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba*, among children attending two schools of Tripoli, Lebanon. A high prevalence of protozoan parasites was found. Although only 50% of children reported digestive symptoms, asymptomatic infection was observed very often, suggesting that these children may act as unknown carriers. In addition, we found that personal contact plays an important role as a risk factor associated with protozoan infection. This epidemiological survey shows the burden of parasitic infections in Lebanese children and provides necessary information to public health authorities for creating prevention and control strategies.

### **Introduction**

Parasitic infections, and in particular those caused by protozoa, are a major public health problem worldwide. They are among the most widespread human infections in developing countries, with children being the most vulnerable population [1].

In particular, intestinal protozoans, such as *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* (syn. *G. intestinalis* and *G. lamblia*), are major causes of diarrhea in children. Transmission of these protozoa is through the oral-fecal route following direct or indirect contact with the infectious stages, including human-to-human, zoonotic, waterborne, and foodborne transmission of both parasites [2], and airborne transmission for *Cryptosporidium* only [2,3]. Additionally, recent data from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS) on the burden and etiology of childhood diarrhea in developing countries has shown that the apicomplexan protists *Cryptosporidium* spp. are nowadays one of the leading causes of moderate to severe diarrhea in children aged under 2 years [4,5]. In addition, *Giardia duodenalis* infects approximately 200 million individuals worldwide, and is particularly common among schoolchildren and in daycare centers [6]. In children under 5 years, *G. duodenalis* infection may produce severe acute diarrhea. Several studies have also suggested that long-term growth retardation can be a consequence of chronic *Giardiasis* [7].

Because of their significant public health and socioeconomic implications, both parasites *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* were included in the WHO's "Neglected disease initiative" in 2004 [8].

Other parasites, such as *Blastocystis* spp. and *Dientamoeba fragilis*, are cosmopolitan protozoans found in the gastrointestinal tract of humans. Nevertheless, the exact contribution of *Blastocystis* spp. and *D. fragilis* to pathogenicity has been controversial. The prevalence of

## RESULTATS

*Blastocystis* spp. in humans varies, from 0.5%–24% in industrialized countries to 30%–76% in developing countries [9]. Recently, a *Blastocystis* spp. prevalence of 100% was found in a Senegalese population of children, being the highest prevalence ever reported worldwide for this parasite [10]. All cases were caused by subtypes (STs) 1, 2, 3 and 4, with a predominance of ST3. The prevalence of *D. fragilis* ranges from 1% to 52%, according to different geographic regions [11].

Recent studies support the pathogenic nature of both parasites. More than half of the children infected by *Blastocystis* spp. in Senegal presented various gastrointestinal disorders [10], and it is now accepted that the classic clinical features of infection with this parasite include gastrointestinal symptoms such as nausea, anorexia, flatulence, and acute or chronic diarrhea [12]. An association of *Blastocystis* spp. with irritable bowel syndrome (IBS) [13] and extraintestinal manifestations, such as urticaria, has also been suggested [14]. Moreover, invasive and inflammatory potential of the parasite has been reported [15].

Regarding *D. fragilis*, infection can be acute or chronic, and symptomatic patients exhibit abdominal pain, persistent diarrhea, loss of appetite, weight loss and flatulence, as well as IBS-like symptoms [16]. Symptoms are observed in 20–58% of infected cases. It has been proposed that *D. fragilis* could be a heterogeneous species, with variants having similar morphology but different virulence [17].

In Lebanon, as in other developing countries, intestinal parasitic infections remain responsible for significant morbidity [18,19]. A previous Lebanese study based on microscopic analysis comparing findings for intestinal parasite prevalence at a major tertiary care center between 1997-1998 and 2007-2008 reported the following prevalences: 0% for *Blastocystis* spp., 0.1% for *Cryptosporidium* spp. and 16% for *G. duodenalis* in the first period, versus 17% for *Blastocystis* spp., 0% for *Cryptosporidium* spp. and 6% for *G. duodenalis* in the second period [20]. Recently, concerning *Blastocystis* spp. and *Cryptosporidium* spp., a prevalence of 19% and 11% respectively, was reported among hospitalized patients after molecular analysis of stool samples [21,22]. Concerning *D. fragilis*, no epidemiological data are available to our knowledge. In addition, little information is available in this country on the potential risk factors associated with these protozoan infections in children.

Therefore, the aim of this study was to identify potential risk factors for transmission and to collect molecular epidemiological data on the prevalence and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis*, *Blastocystis* spp. and *D. fragilis* in a population of children attending two schools of different socioeconomic levels in Tripoli, Lebanon.

# RESULTATS

## Materials and methods

### *Ethics Statement*

The authorization to conduct this study was obtained from the Lebanese Minister of Public Health (reference number 4-39716). Written informed consents were obtained from the parents or legal guardians of the children, after a clear explanation of the research objectives. This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

### *Questionnaire survey*

A standard questionnaire was completed by interviewing the child's parents or legal guardians, who had given informed consent, in order to obtain a socioeconomic and demographic description including the age, gender, education, residence, occupation and estimated monthly income of the parents, behavioral habits (intake of fruits, vegetables and fast food), health conditions, presence of symptoms (i.e. abdominal pain, diarrhea, vomiting, fever, nausea, headache and discomfort), family members with gastrointestinal disorders, history of previous hospitalizations and medical treatments. Environmental conditions, such as type of water supply, sewage disposal system and presence of domestic animals, were also investigated.

### *Study population and collection of samples*

This cross-sectional study was conducted in Tripoli (latitude 34° 26' 12 N, longitude 35° 50' 58 E), the largest city in northern Lebanon, and the second largest city in the country in terms of demographic and economic importance. The city, situated 85 kilometers (53 miles) north of the capital Beirut, has a Mediterranean climate with mild winters and moderately hot summers. Tripoli's population is estimated at 500,000 people. Stool samples were collected in 2 nearby schools of different socioeconomic status in Tripoli (Al Zahra' School and Jil Alwa'ed School) (**Figure 1**) from two hundred and forty-nine children (149 boys and 100 girls aged between 3 and 16 years) in January 2013. The sample size corresponded to the total number of samples that could be collected for logistical reasons during a specific period of time. The participants were categorized into three groups according to age: under 5 years, between 5 and 9 years and over 9 years, and into two groups according to socioeconomic status: low socioeconomic status (LSES) and high socioeconomic status (HSES). The measure of SES was based on the income, education and occupation of the parents. One fresh

## RESULTATS

stool sample per child was collected in a sterile container and transported immediately to the Department of Microbiology of the AZM Center in Tripoli.

### ***Parasitological analyses***

All stool samples were examined macroscopically, and their characteristics, such as color, consistency, presence of blood, and presence of helminths were recorded. These specimens were also examined by direct-light microscopy (DLM) of wet mounts. For the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts, modified Ziehl-Neelsen (MZN) staining was performed [23], and the slides were examined at 1,000× magnification. For quality control, all examinations were repeated twice by two experienced microscopists. No information was available about potential viral or bacterial infections in these stool samples.

### ***DNA extraction, species identification and subtyping***

All stool specimens were used for molecular detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *D. fragilis* and *G. duodenalis*. DNA was extracted from approximately 250 mg of stool samples using the QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommended procedures. The DNA was eluted in 100 µl of elution buffer (Qiagen) and stored at -20 °C until use. The 18S rRNA detection was performed by nested PCR for *Cryptosporidium* spp. [24] and by real-time PCR for *Blastocystis* spp. [25], *D. fragilis* [26] and *G. duodenalis* [27], as previously described. To further identify *Giardia* assemblages, the triose-phosphate isomerase (*TPI*) gene was amplified by nested PCR as previously described [28]. *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis*-positive PCR products were purified and directly sequenced on both strands by Genoscreen (Lille, France) or Beckman Coulter Genomics (Essex, United Kingdom). The sequences obtained were aligned using the BioEdit v7.0.1 package (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), then compared with gene sequences of these parasites available from the NCBI server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), using the basic local alignment search tool (BLAST). *Blastocystis* spp. STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known STs, according to the updated classification of Alfellani *et al.* [29]. Specimens genotyped as *C. parvum* or *C. hominis* were further subtyped using nested PCR in order to amplify a fragment of the 60 kDa glycoprotein (*gp60*) gene, as described previously [30].

The amplified DNA fragments were purified and sequenced on both strands, then analyzed by alignment of *gp60* sequences with reference sequences retrieved from GenBank using the ClustalX program (<http://www.clustal.org/>). *C. parvum* and *C. hominis* *gp60* subtypes were



## RESULTATS

named by counting the number of trinucleotide repeats of TCA (A), TCG (G), and TCT (T), and the ACATCA repeat (R) after the trinucleotide repeats [31].

All sequences were uploaded to NCBI GenBank (accession numbers KU311720-KU311975).

### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using Stata software, version 13 (StataCorp, College Station, TX, US). The tests were two-sided, with a type I error set at  $\alpha=0.05$ . Quantitative data was presented as the mean  $\pm$  standard deviation or the median [interquartile range]. The categorical data was presented as frequency and associated proportions. The differences across groups were compared using (1) the Student's t-test or Mann-Whitney U-test when the conditions of the t-test were not met for continuous variables (assumption of normality studied using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by the Fisher-Snedecor test), and (2) the chi-squared test or Fisher's exact test for categorical parameters. Logistic regression models were created to calculate the odds ratios (OR) and 95% confidence interval considering parasite infections as the main outcome. Analyses were based on parasite detection using molecular tools.

## **Results**

### *Prevalence of protozoan infections*

A total of 249 schoolchildren (149 male, 100 female) were included in this study. Among them, 157 belonged to the LSES group (mostly children from the Al-Zahra' School) and the remaining 92 to the HSES group (mostly children from the Jil Alwa'ed School). The age of the participants was between 3 and 16 years (mean age:  $10.3 \pm 2.7$ ) (**Table 1**).

Overall, based on PCR and light microscopy examination, 85% (212/249) of the children were found to be positive for at least one intestinal parasitic infection. Out of a total of 212 infected schoolchildren, the distribution of parasitic infections in males and females was 61% (129/212) and 39% (83/212), respectively. When socioeconomic status was considered, the prevalence was as follows: 65% (138/212) of children in the LSES group and 35% (74/212) in the HSES group. No significant statistical differences regarding parasitic infections related to gender or socioeconomic status were observed. The demographic characteristics of the study population are shown in Table 1.

After molecular analysis of the samples, *Blastocystis* spp. had the highest infection rate (63%), followed by *D. fragilis* (60.6%), *G. duodenalis* (28.5%) and *Cryptosporidium* spp. (10.4%). As expected, the prevalence of these protozoans was lower in microscopic

## RESULTATS

examination of wet mounts (51.6%, 0%, 14.4%, and 5.6% respectively). Other intestinal parasites were also detected by DLM, as follows: *Entamoeba histolytica/dispar* (5.6%), *Entamoeba coli* (2.4%), *Ascaris lumbricoides* (0.4%), and *Hymenolepis nana* (0.4%).

Mixed infections with two parasites were found in 35.7% of children (89/249). The most common dual infection was with *Blastocystis* spp. and *D. fragilis*, with a prevalence of 68.5% (61/89). In addition, 11.6% (29/249) of children exhibited triple parasitic infections with *Blastocystis* spp., *D. fragilis* and *G. duodenalis*. Other cases of mixed infections are shown in Figure 2.

### ***Clinical manifestations and risk factors for transmission***

In total, 125 out of 249 children had symptoms at the time of the survey. Among parasitized children, gastrointestinal symptoms were common (55%). Abdominal pain, diarrhea, vomiting, and fever were reported in 51% (108/212), 28% (60/212), 11% (23/212), and 6% (12/212) of children, respectively. Of the total of 157 *Blastocystis* spp., 151 *D. fragilis*, 71 *G. duodenalis* and 26 *Cryptosporidium* spp.-infected children, 45%, 47%, 69%, and 27% respectively, were asymptomatic.

A logistic regression model was created to identify the risk factors for transmission of these intestinal parasitic infections. The overall presence of abdominal pain (OR: 5.4, CI: 2.1-13.4, P<0.001) and diarrhea (OR: 4.5, CI: 1.3-15.1, P: 0.009), and having members of the same household with gastrointestinal symptoms (OR: 9.6, CI: 2.2-40.9, P<0.001) were significantly predictive of the risk of intestinal parasitic infections in children.

Distribution of protozoan infections among children according to risk factors is shown in Table 2. Univariate logistic regression analysis showed the presence of abdominal pain (OR: 1.9, CI: 1.1-3.2, P: 0.02) and contact with parents having gastrointestinal symptoms (OR: 1.9, CI: 1.0-3.4, P: 0.03) to be the main factors significantly associated with *Blastocystis* spp. infection.

In the group composed of 151 *D. fragilis*-infected children, univariate logistic regression analysis showed that contact with members of the same household having gastrointestinal symptoms (OR: 2.2, CI: 1.2-3.9 P: 0.01) was the only risk factor associated with the presence of this parasite (Table 2). *D. fragilis*-infected children were 4 times more likely to be infected with *Blastocystis* spp. (OR: 3.6 CI: 2.1-6.3, P<0.001).

The logistic regression analysis found significant associations between *G. duodenalis* infection and eating raw vegetables and fruits (OR: 2.7, CI: 1.2-6.2, P :0.01), contact with members of the same household having gastrointestinal symptoms (OR: 4.9, CI: 2.7-8.9, P

## RESULTATS

<0.001), and presence of gastrointestinal symptoms (OR:4.3, CI: 2.8-8.0, P <0.001), such as abdominal pain (OR:4.7, CI:2.6-8.5, P <0.001) and diarrhea (OR:2.4, CI:1.3-4.4, P :0.004). On the other hand, HSES (OR: 0.3, CI: 0.2-0.6, P<0.001), eating outside of the home (OR=0.3, CI: 0.1-0.7, P: 0.003), and drinking treated water (OR: 0.3, CI: 0.1-0.7, P: 0.003) were protective factors against *G. duodenalis* infection (Table 2).

The univariate logistic regression analysis showed that children aged under 5 years had a 6 times higher risk of *Cryptosporidium* spp. infection compared with older children (OR: 6.4, CI: 1.9 – 21.3, P: 0.006). Eating outside of the home (OR: 2.4, CI: 1.1-5.6, P: 0.04) and presence of gastrointestinal symptoms (OR: 3.1, CI: 1.2-7.6, P: 0.01), especially diarrhea (OR: 4.1, CI: 1.8-9.5, P <0.001) or fever (OR: 6.4, CI: 1.9-21.3, P: 0.006), were other factors significantly associated with this infection (Table 2).

### ***Species identification and subtyping***

The real-time PCR products of the 157 samples positive for *Blastocystis* spp. were all sequenced on both strands. With 99% to 100% sequence identity to the reference sequences, 138 isolates corresponded to single infections by one ST, and 3 different STs were identified as follows: ST3 (46.3% of isolates), ST2 (28.3%) and ST1 (25.4%). For the remaining 19 samples, sequence chromatogram analysis revealed the presence of double traces, suggesting mixed infection by different STs that were not identified.

In addition, the PCR products of the 26 samples positive for *Cryptosporidium* spp. were successfully sequenced on both strands. Among them, 20 isolates (77%) were identified as *C. hominis*, while 6 isolates (23%) were identified as *C. parvum*, all with more than 99% sequence identity to homologous sequences. *Cryptosporidium* spp. other than *C. parvum* and *C. hominis* were not found. Sequence analysis of the *gp60* gene identified the *C. hominis* isolates as belonging to two subtypes: IaA18R3 (4/20) and IbA10G2 (16/20). All of the *C. parvum* isolates were identified as the IIaA15G1R1 subtype.

The *Giardia* assemblage was successfully determined by sequencing of the *TPI* gene from 67 of the 71 isolates previously identified by *18 rRNA* PCR. DNA sequencing of the *TPI* gene failed for the 4 others samples. Assemblage B was found in the majority of the samples (64/67), followed by assemblage A (2/67) and a mixed-assemblage infection (1/67).

## RESULTATS

### Discussion

#### *Prevalence of protozoan infections*

This study demonstrates that protozoan parasitic infections are very common among a community of children living in Tripoli, independent of their socioeconomic status. Such a prevalence is high, considering that the study was performed in an urban area and relied on the collection of a single stool sample per child, instead of the ideal three consecutive samples. A recent study among schoolchildren primarily in rural Malaysia reported a prevalence of parasitic infections of 98% [32].

The most frequent intestinal parasites detected were *Blastocystis* spp. and *D. fragilis*, followed by *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. These 4 protozoans were detected by molecular tools, which are advantageous due to their high sensitivity and specificity. DLM was performed in order to detect co-infection with additional parasites such as helminths, which were identified with a lower prevalence. Although microscopic detection of helminths is widely used as a diagnostic method, microscopy is not very sensitive when infections are light, especially in asymptomatic persons. In addition, specific techniques for the diagnosis of certain nematodes such as *Enterobius vermicularis* were not used.

In the present study, 63% of children were found to be infected with *Blastocystis* spp. after molecular identification. In a previous survey of our group, a lower prevalence of 19% was found in a population of Lebanese symptomatic and asymptomatic patients after microscopic examination of stools [22]. Today, *Blastocystis* spp. is considered an under-reported parasite, with a worldwide distribution and a prevalence far exceeding that of other intestinal parasites in the human population [33,34]. Indeed, its prevalence can reach 100% in developing countries and has been reported at between 1.5% and 20% in industrialized countries [10,33]. The current prevalence of *Blastocystis* spp. among schoolchildren was high, as observed in other countries such as Senegal (100%) [7], Egypt (33%) [35], Syria (28%) [36], the USA (23%) [37], and Pakistan (17%) [38], even if detection methods in these studies are not the same.

Using PCR tools, the prevalence of *D. fragilis* reached 61%. A previous study using microscopic techniques reported a prevalence of 38% of *D. fragilis* in adult workers in the food sector, in the same geographic area of Lebanon [19]. In addition, in our study, we found a significant association between *Blastocystis* spp. and *D. fragilis* co-infection in children ( $P < 0.001$ ). An association between these two protozoans has recently been reported in

## RESULTATS

children presenting gastrointestinal symptoms in the Netherlands [39] and in asymptomatic people in two poor communities in Brazil [40].

*G. duodenalis* is one of the most common causes of waterborne disease outbreaks associated with drinking water [41,42]. The prevalence found in our study (29%) is considerably higher than that in other Middle Eastern countries with similar standards of living or in European countries (e.g. Italy, Germany, the UK, Portugal) [43]. In addition, the current prevalence of giardiasis in Lebanon is six times higher than that observed in 2004 (5%) [18]. Nevertheless, the higher sensitivity of molecular tools for the detection of this parasite could likely explain this difference. Even if diagnostic tools were different, recent studies in asymptomatic children around the world reported giardiasis prevalence of 1% in the USA [37], 1% in Italy [44], 1% in the United Kingdom [45], 2% in Germany [46], 7% in Portugal [47], 7% in Pakistan [38], 15% in Syria [36], 16% in Spain [48], 18% in Yemen [49], 32% in Russia [50], and 57% in Cuba [51].

Regarding *Cryptosporidium* spp., this apicomplexan protozoan is one of the most common intestinal parasitic pathogens in the world [52]. Cryptosporidiosis rates are higher in children and immunocompromised patients than in the healthy adult population [53]. However, cryptosporidiosis prevalence varies in different countries: between 1% and 5% in children with diarrhea in developed countries, reaching 49% in developing countries [53,54,55]. Although varying in technical diagnostic tools, the prevalence that we found in children in Lebanon (10%) was in the same range as that observed in Yemen (10%) [31], but lower than that found in others Middle Eastern countries such as Jordan (19%) [56] and Egypt (49%) [55].

Our results based on conventional microscopy showed that infection with *E. histolytica/dispar* is prevalent in Lebanon at the present time. Previous studies among presumably older healthy subjects in 2004 reported a prevalence of 2% [57]. It is also more prevalent than in other Middle Eastern countries, such as Syria (0.01%) [36], Qatar (0.3%) [58] and Iran (0.4 - 2%) [59,60], and in other developed [37] and developing countries [61]. Nevertheless, the parasite is less common than in other developing countries like Pakistan (14%) [38], Yemen (17%) [49], and India (18%) [62]. In a recent study to assess the prevalence and genetic diversity of *E. histolytica* in individuals with gastrointestinal symptoms in a rural area of southern Ethiopia, a prevalence of 3.3% was found [63]. The fact that we did not use PCR to detect this parasite strongly suggests that the actual prevalence of these enteric species is likely to be an underestimate.

## RESULTATS

In a case-control study investigating the prevalence of *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* and *G. duodenalis* among children < 2 years of age, with and without diarrhea, in Dar es Salaam, Tanzania, an overall high prevalence of these parasites was observed. *Cryptosporidium* spp. infection was more commonly found among young Tanzanian children with diarrhea and *G. duodenalis* infection was frequently asymptomatic [64]. Concerning the high prevalence of co-infections of pathogenic and nonpathogenic parasites, our results are comparable to those of other studies [65,66]. The observed polyparasitism could be explained by shared risk factors for parasite infection, such as poor sanitation and hygiene behavior and the fact that the transmission route of these parasites is mainly through the fecal-oral pathway [66].

### ***Clinical manifestations and associated risk factors***

In total, 125 children out of 249 had symptoms at the time of the survey. In relation to the main clinical features of infections, it was found, as expected, that diarrhea was significantly common among *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* spp.-infected children, but no significant association with this symptom was observed regarding *Blastocystis* spp. or *D. fragilis* infections. The interactions and confounding effects that are not evident in a simple comparison of the two groups could also explain the absence of significant associations. Nevertheless, a positive association regarding *Blastocystis* spp. and abdominal pain suggests a pathogenic role for this parasite of controversial clinical significance [67]. Even if children harboring *D. fragilis* presented more gastrointestinal symptoms, no significant association was found between this parasite and gastrointestinal disorders in children. Recent studies described that *D. fragilis* has struggled to gain recognition as a pathogen, despite the evidence supporting its pathogenic nature [68]. Interestingly, the 124 other children were asymptomatic for protozoan infection and may be carriers responsible for transmission. Consistently, a study among Spanish children attending day care facilities showed that both *G. duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. infections were asymptomatic in 82% of cases [48].

Concerning the risk factors for protozoan infections, our data analysis found that protozoan parasites could infect both genders in all age groups. However, an age of less than 5 years was significantly associated only with *Cryptosporidium* spp. infection. The reason for this high prevalence is likely due to the immature immunity of young children exposed to this opportunistic parasite [69]. As reported by other authors, no association was found between either gender or age and prevalence of *G. duodenalis* infection [47]. It is not yet fully

## RESULTATS

understood why age plays a role in the frequency of *Cryptosporidium* spp. infection, but is not associated with the frequency of giardiasis [70].

Intestinal parasites are usually considered poverty-related diseases [71]. However, no significant association was identified between socioeconomic status and the overall rate of parasitic infections in our study population. Nevertheless, the prevalence of *G. duodenalis* was significantly higher in LSES infected children. Interestingly, in a previous study conducted in Peru, *Giardia* spp. and microsporidia were the predominant intestinal parasites among the poorest population, and infections with *Cryptosporidium* spp. were independent of wealth [70]. Furthermore, in our study, only LSES children were infected with helminths (*Ascaris lumbricoides* and *Hymenolepis nana*).

In addition, children who drank untreated water had a 3 times higher risk of infection with *G. duodenalis* than those who drank treated water (P: 0.003). Two meta-analyses, including 84 studies in 28 countries, concluded that the quantity of water available to the population in developing countries has more impact on endemic diarrhea cases than water purity itself [72,73]. For the study population in Lebanon, the accessibility of the water supply was not a problem. However, a majority of households did not have a proper sanitary system, favoring fecal contamination via ground seepage, as previously described [74].

The findings of the present study showed that children who had contact with family members presenting gastrointestinal symptoms had a higher risk of infection with these parasites, confirming the direct human-to-human transmission of these protozoans. Thus, the screening and treatment of family members of infected children should be considered for the prevention and control of these infections. Additionally, indirect transmission through contaminated food (raw vegetables and fruits) was found to be a risk factor for giardiasis. In fact, this association is likely due to the fact that fresh vegetables and fruits may be eaten without washing them or with contaminated hands, and it is well known that contaminated hands can play a major role in fecal-oral transmitted diseases [44]. On the other hand, meals outside of the home were significantly associated with *Cryptosporidium* spp. infection.

### **Genotyping/subtyping of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* isolates**

The genotyping/subtyping of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* isolates allows an elucidation of the transmission of these parasites. The majority of *Blastocystis* spp.-positive samples included in this study represented mono-infections (88%) by one ST. Among these positive isolates, three STs were detected as follows: ST3 was the

## RESULTATS

most abundant, followed by ST2 and ST1 (35/138). Our previous study in the Lebanese population also identified the same three STs, with a predominance of ST3 and ST2 [22]. The majority of human *Blastocystis* spp. infections around the world are attributed to ST3 isolates, followed by ST1 and ST2, which is consistent with spread directly from person to person [75]. Interestingly, ST4 was not found in our study. Overall, this ST is common in Europe, but much less frequent in Lebanon as well as in Middle Eastern, African, American and Asian countries [75].

In our cohort of schoolchildren, molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolates allowed the identification of *C. parvum* and *C. hominis*, with a predominance of the latter species. It is well known that human cryptosporidiosis is mainly caused by these two species, with *C. parvum* considered a zoonotic species while *C. hominis* has been mainly associated with anthroponotic transmission [52]. Consistently, a potential secondary transmission of infection among family members was significantly associated with this infection.

These results are consistent with our recent study describing the predominance of *C. hominis* in Lebanese hospitalized patients [21]. However, we found different subtypes than those reported in the previous study from our group [21]. Two subtypes belonging to the subtype families Ia and Ib, IaA18R3 and IbA10G2, were identified. The subtype IdA19, which has been described as the predominant subtype in Lebanese hospitalized patients [21], was not found in schoolchildren. The subtype family IbA10G2 has been commonly reported around the world, and is the predominant cause of waterborne outbreaks due to *C. hominis* [76]. However, IaA18R3 is a rare subtype recently reported in India and Spain [77,78]. All subtyped *C. parvum* isolates were identified as the IIaA15G1R1 subtype. This zoonotic subtype has been reported in both humans and animals in many geographic areas of the world [79]. Moreover, the *C. parvum* IIa subtype family has a high genetic diversity, and is responsible for the majority of cryptosporidiosis outbreaks due to *C. parvum* [76]. However, the IIc and IId subtype families, which are reported mostly in developing countries, had not been described in Lebanon [55,56,80,81].

Molecular characterization of *G. duodenalis* isolates according to *TPI* sequence analysis allowed the identification of assemblages A and B with a large predominance of assemblage B (97%). Both assemblages have been described as zoonotic. However, assemblage B seems to be more human specific [43]. Our results are consistent with other studies among children in other countries such as Brazil, Nepal, and Iran reporting a predominance of assemblage B [82]. Additionally, the association between assemblage occurrence and the age of patients



## RESULTATS

showing higher risk of assemblage B infection in children under 12 years old has been described [83].

### Conclusions

To our knowledge, this is the first study reporting epidemiological data on intestinal protozoan infections among schoolchildren in Lebanon, independent of socioeconomic status. Our results showed a high prevalence of protozoan parasites among this population, *Blastocystis* spp. being the most predominant protozoan. In addition, although 50% of children reported symptoms, many of them were asymptomatic, and these children could serve as unidentified carriers. Contact with family members with gastrointestinal disorders was found to be the main risk factor associated with the presence of protozoan infections. The role of person-to-person contact in the specific transmission of *Blastocystis* spp. and *Cryptosporidium* spp. isolates was consistent with the results of subtyping. The findings of this study provide useful information for the design of prevention strategies, and interventions in target communities at risk.

### Acknowledgments

We would like to thank Mariane Ecco and Taha Abdou for their assistance in the collection of samples and for their support, Halima El Cheikh for her assistance in the design of Figure 1, and Nigel J. Clifford for the critical review of the manuscript.

### References

1. Harhay MO, Horton J, Olliaro PL (2010) Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 219-234.
2. Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV (2005) Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430-437.
3. Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S (2014) The evolution of respiratory Cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clin Microbiol Rev* 27: 575-586.
4. Striepen B (2013) Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature* 503: 189-191.
5. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, et al. (2013) Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries

## RESULTATS

- (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382: 209-222.
6. Heresi GP, Murphy JR, Cleary TG (2000) Giardiasis. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases Journal* 11: 189-195.
  7. Maikai BV, Umoh JU, Lawal IA, Kudi AC, Ejembi CL, et al. (2012) Molecular characterizations of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* in humans in Kaduna State, Nigeria. *Exp Parasitol* 131: 452-456.
  8. Savioli L, Smith H, Thompson A (2006) *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* 22: 203-208.
  9. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, et al. (2013) *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis* 1: 167-178.
  10. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, et al. (2014) Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis* 14: 164.
  11. Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D (2011) A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes* 2: 3-12.
  12. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR (2013) Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol* 82: 1-32.
  13. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El Alaoui H (2012) New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog* 8: e1002545.
  14. Verma R, Delfanian K (2013) *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *Am J Med Sci* 346: 80-81.
  15. Frealle E, El Safadi D, Cian A, Aubry E, Certad G, et al. (2015) Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg Infect Dis* 21: 91-94..
  16. Fletcher S, Caprarelli G, Merif J, Andresen D, Hal SV, et al. (2014) Epidemiology and geographical distribution of enteric protozoan infections in Sydney, Australia. *J Public Health Res* 3: 298.
  17. Vandenberg O, Peek R, Souayah H, Dediste A, Buset M, et al. (2006) Clinical and microbiological features of dientamoebiasis in patients suspected of suffering from a

## RESULTATS

- parasitic gastrointestinal illness: a comparison of *Dientamoeba fragilis* and *Giardia lamblia* infections. *Int J Infect Dis* 10: 255-261.
18. Hamze M, Dabboussi F, Al-Ali K, Ourabi L (2004) [Prevalence of infection by intestinal parasites in north Lebanon: 1997-2001]. *East Mediterr Health J* 10: 343-348.
  19. Hamze M, Naja M, Mallat H (2008) [Biological analysis of workers in the food sector in north Lebanon]. *East Mediterr Health J* 14: 1425-1434.
  20. Araj GF, Musharrafieh UM, Haydar A, Ghawi A, Itani R, et al. (2011) Trends and prevalence of intestinal parasites at a tertiary care center in Lebanon over a decade. *J Med Liban* 59: 143-148.
  21. Osman M, El Safadi D, Benamrouz S, Guyot K, Dei-Cas E, et al. (2015) Initial data on the molecular epidemiology of cryptosporidiosis in Lebanon. *PLoS One* 10: e0125129.
  22. El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, et al. (2013) Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg* 88: 1203-1206.
  23. Henriksen SA, Pohlenz JF (1981) Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22: 594-596.
  24. . Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, et al. (1999) Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 65: 3386-3391.
  25. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, et al. (2011) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 49: 975-983.
  26. Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2006) Evaluation of three diagnostic methods, including real-time PCR, for detection of *Dientamoeba fragilis* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 44: 232-235.
  27. Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MA, van Lieshout L, et al. (2003) Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes* 17: 223-225.
  28. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, et al. (2003) Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9: 1444-1452.

## RESULTATS

29. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, et al. (2013) Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist* 164: 497-509.
30. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, et al. (2003) Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol* 41: 2744-2747.
31. Alyousefi NA, Mahdy MA, Lim YA, Xiao L, Mahmud R (2013) First molecular characterization of *Cryptosporidium* in Yemen. *Parasitology* 140: 729-734.
32. Al-Delaimy AK, Al-Mekhlafi HM, Nasr NA, Sady H, Atroosh WM, et al. (2014) Epidemiology of intestinal polyparasitism among Orang Asli school children in rural Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3074.
33. Tan KS (2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 21: 639-665.
34. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, et al. (2013) Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop* 126: 11-18.
35. Rayan HZ, Ismail OA, El Gayar EK (2007) Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J Egypt Soc Parasitol* 37: 599-608.
36. Al-kafri A, Harba A (2009) Intestinal Parasites in Basic Education Pupils in Urban and Rural Idlb. *Syrian Clinical Laboratory Revues* 5: 2-5.
37. Amin OM (2002) Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg* 66: 799-803.
38. Mehraj V, Hatcher J, Akhtar S, Rafique G, Beg MA (2008) Prevalence and factors associated with intestinal parasitic infection among children in an urban slum of Karachi. *PLoS One* 3: e3680.
39. Maas L, Dorigo-Zetsma JW, de Groot CJ, Bouter S, Plotz FB, et al. (2014) Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 20: 545-550.
40. David EB, Guimaraes S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, et al. (2015) Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors* 8: 103.
41. Baldursson S, Karanis P (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res* 45: 6603-6614.

## RESULTATS

42. Yoder JS, Wallace RM, Collier SA, Beach MJ, Hlavsa MC (2012) Cryptosporidiosis surveillance--United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ* 61: 1-12.
43. Ryan U, Caccio SM (2013) Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol* 43: 943-956.
44. Guidetti C, Ricci L, Vecchia L (2010) [Prevalence of intestinal parasitosis in Reggio Emilia (Italy) during 2009]. *Infez Med* 18: 154-161.
45. Davies AP, Campbell B, Evans MR, Bone A, Roche A, et al. (2009) Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatr Infect Dis J* 28: 838-840.
46. Sagebiel D, Weitzel T, Stark K, Leitmeyer K (2009) Giardiasis in kindergartens: prevalence study in Berlin, Germany, 2006. *Parasitol Res* 105: 681-687.
47. Julio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, et al. (2012) Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. *Parasit Vectors* 5: 22.
48. Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, et al. (2014) Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine (Baltimore)* 93: e75.
49. Alyousefi NA, Mahdy MA, Mahmud R, Lim YA (2011) Factors associated with high prevalence of intestinal protozoan infections among patients in Sana'a City, Yemen. *PLoS One* 6: e22044.
50. Kramar LV, Reznikov EV, Kramar OG (2003) Prevalence of giardiasis in Volgograd city population. *Med Parazitol (Mosk)*: 38-39.
51. Canete R, Diaz MM, Avalos Garcia R, Laud Martinez PM, Manuel Ponce F (2012) Intestinal parasites in children from a day care centre in Matanzas City, Cuba. *PLoS One* 7: e51394.
52. Chalmers RM, Katzer F (2013) Looking for *Cryptosporidium* : the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol* 29: 237-251.
53. ANOFEL (2010) Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. *Euro Surveill* 15: 19642.
54. Cardona GA, Carabin H, Goni P, Arriola L, Robinson G, et al. (2011) Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Alava, North of Spain. *Sci Total Environ* 412-413: 101-108.

## RESULTATS

55. Helmy YA, Krucken J, Nockler K, von Samson-Himmelstjerna G, Zessin KH (2013) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Vet Parasitol* 193: 15-24.
56. Hijjawi N, Ng J, Yang R, Atoum MF, Ryan U (2010) Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Exp Parasitol* 125: 161-164.
57. Saab BR, Musharrafieh U, Nassar NT, Khogali M, Araj GF (2004) Intestinal parasites among presumably healthy individuals in Lebanon. *Saudi Med J* 25: 34-37.
58. Abu-Madi MA, Behnke JM, Doiphode SH (2010) Changing trends in intestinal parasitic infections among long-term-residents and settled immigrants in Qatar. *Parasit Vectors* 3: 98.
59. Tappeh Kh H, Mohammadzadeh H, Rahim RN, Barazesh A, Khashaveh S, et al. (2010) Prevalence of Intestinal Parasitic Infections among Mentally Disabled Children and Adults of Urmia, Iran. *Iran J Parasitol* 5: 60-64.
60. Pestehchian N, Nazary M, Haghghi A, Salehi M, Yosefi H (2011) Frequency of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* prevalence among patients with gastrointestinal complaints in Chelgerd city, southwest of Iran(\*). *J Res Med Sci* 16: 1436-1440.
61. Escobedo AA, Canete R, Nunez FA (2008) Prevalence, risk factors and clinical features associated with intestinal parasitic infections in children from San Juan y Martinez, Pinar del Rio, Cuba. *West Indian Med J* 57: 377-382.
62. Parameshwarappa K, Chandrakanth C, Sunil B (2012) The Prevalence of Intestinal Parasitic Infestations and the Evaluation of Different Concentration Techniques of the Stool Examination. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 4662:2392.
63. Flecha MJ, Benavides CM, Tissiano G, Tesfamariam A, Cuadros J, et al. (2015) Detection and molecular characterisation of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba* spp. among patients with gastrointestinal symptoms in Gambo Hospital, Oromia Region, southern Ethiopia. *Trop Med Int Health* 20: 1213-1222.
64. Tellevik MG, Moyo SJ, Blomberg B, Hjollo T, Maselle SY, et al. (2015) Prevalence of *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* among Young Children with and without Diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004125.

## RESULTATS

65. Ouattara M, N'Guessan N A, Yapi A, N'Goran E K (2010) Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among schoolchildren in Agboville area (Côte d'Ivoire). PLoS Negl Trop Dis 4: e574.
66. Hurlimann E, Yapi RB, Hougbedji CA, Schmidlin T, Kouadio BA, et al. (2014) The epidemiology of polyparasitism and implications for morbidity in two rural communities of Côte d'Ivoire. Parasit Vectors 7: 81.
67. Mehlhorn H, Tan KS, Yoshikawa H (2012) *Blastocystis*: Pathogen or Passenger?: Springer. 225 p.
68. Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, et al. (2010) A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. Am J Trop Med Hyg 82: 614-619.
69. Fournet N, Deege MP, Urbanus AT, Nichols G, Rosner BM, et al. (2013) Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. Euro Surveill 10;18(2). pii: 20348.
70. Nundy S, Gilman RH, Xiao L, Cabrera L, Cama R, et al. (2011) Wealth and its associations with enteric parasitic infections in a low-income community in Peru: use of principal component analysis. Am J Trop Med Hyg 84: 38-42.
71. Osei-Atweneboana MY, Lustigman S, Prichard RK, Boatin BA, Basanez MG (2012) A research agenda for helminth diseases of humans: health research and capacity building in disease-endemic countries for helminthiasis control. PLoS Negl Trop Dis 6: e1602.
72. Esrey SA, Feachem RG, Hughes JM (1985) Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: improving water supplies and excreta disposal facilities. Bull World Health Organ 63: 757-772.
73. Esrey SA, Collett J, Miliotis MD, Koornhof HJ, Makhale P (1989) The risk of infection from *Giardia lamblia* due to drinking water supply, use of water, and latrines among preschool children in rural Lesotho. Int J Epidemiol 18: 248-253.
74. Schmidt M, Al-Nozaily F, Al-Ghorbany A (2008) Standards for and Evaluation of Small-Scale Dam Projects in Yemen. Standards and Thresholds for Impact Assessment. pp. 133-144.
75. Stensvold CR (2013) *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. Trop Parasitol 3: 26-34.
76. Chalmers RM (2012) Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. Ann Ist Super Sanita 48: 429-446.

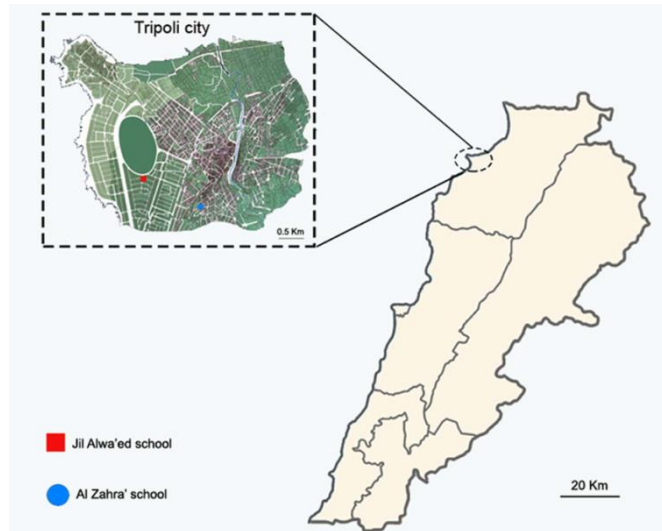
## RESULTATS

77. Sharma P, Sharma A, Sehgal R, Malla N, Khurana S (2013) Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *Int J Infect Dis* 17: e601-605.
78. Fuentes I, Martin C, Beristain X, Mazon A, Saugar JM, et al. (2014) *Cryptosporidium hominis* genotypes involved in increased incidence and clusters of cases, Navarra, Spain, 2012. *Epidemiol Infect*: 1-4.
79. Ryan U, Fayer R, Xiao L (2014) *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141: 1667-1685.
80. Nazemalhosseini-Mojarad E, Haghighi A, Taghipour N, Keshavarz A, Mohebi SR, et al. (2011) Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Vet Parasitol* 179: 250-252.
81. Adamu H, Petros B, Zhang G, Kassa H, Amer S, et al. (2014) Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2831.
82. El Fatni C, Olmo F, El Fatni H, Romero D, Rosales MJ (2014) First genotyping of *Giardia duodenalis* and prevalence of enteroparasites in children from Tetouan (Morocco). *Parasite* 21: 48.
83. Mahdy AK, Surin J, Mohd-Adnan A, Wan KL, Lim YA (2009) Molecular characterization of *Giardia duodenalis* isolated from Semai Pahang Orang Asli (Peninsular Malaysia aborigines). *Parasitology* 136: 1237-1241.



# RESULTATS

**Figure 1. Map of Tripoli, showing the location of Al Zahra' and Jil Alwa'ed schools**



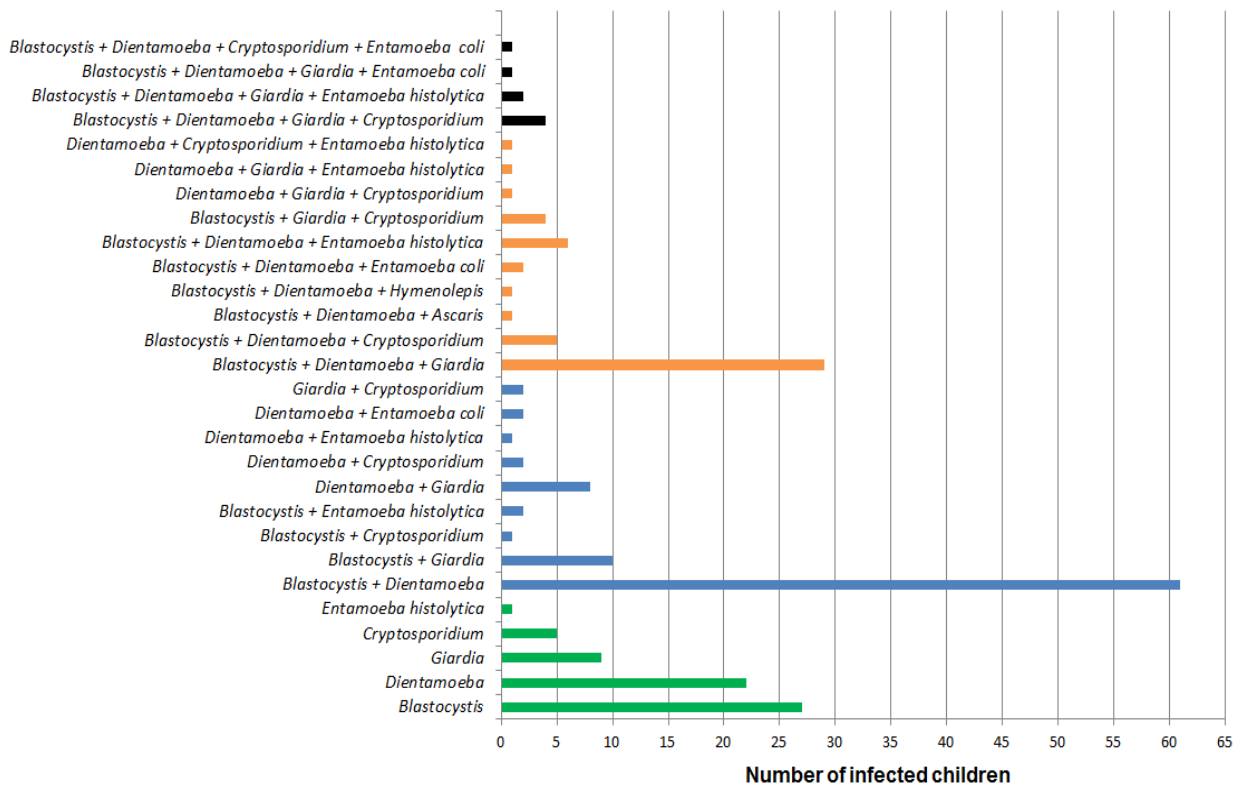
**Table 1. Demographic characteristics of the study population**

	Non-infected children (N=37)	Infected children (N=212)
Age (median)	8.48 ± 0.50	9.5 ± 0.21
Gender		
Male	20	129
Female	17	83
Children in the LSES group	19	138
Children in the HSES group	18	74

LSES: low socioeconomic status, HSES: high socioeconomic status

## RESULTATS

**Figure 2. Distribution of single and mixed parasitic infections in schoolchildren in Tripoli.** Single, double, triple and quadruple infections are shown. Prevalences of *Blastocystis* spp., *D. fragilis*, *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* are based on molecular diagnosis.



# RESULTATS

**Table 2. Distribution of protozoan infections among schoolchildren in Tripoli according to risk factors**

Risk factor	<i>Blastocystis</i> spp.		<i>Dientamoeba fragilis</i>		<i>Giardia duodenalis</i>		<i>Cryptosporidium</i> spp.		
	Prevalence *% (N)	<i>P</i> -value; OR (IC95%)	Prevalence *% (N)	<i>P</i> -value; OR (IC95%)	Prevalence *% (N)	<i>P</i> -value; OR (IC95%)	Prevalence *% (N)	<i>P</i> -value; OR (IC95%)	
Age	< 5 years	61.5% (8/13)	1.0; 0.93 [0.3 – 2.9]	53.8% (7/13)	0.77; 0.74 [0.2 – 2.3]	23.1% (3/13)	0.76; 0.74 [0.2 – 2.8]	38.4% (5/13)	<b>0.006;</b> <b>6.4 [1.9 – 21.3]</b>
	≥ 5 years	63.1% (149/236)		61% (144/236)		28.8% (68/236)		8.9% (21/236)	
Sex	Male	66.4% (99/149)	0.18; 1.4 [0.9 – 2.4]	63.1% (94/149)	0.34; 1.3 [0.8 – 2.2]	31.5% (47/149)	0.20; 1.5 [0.8 – 2.6]	10.7% (16/149)	0.85; 1.1 [0.5 – 2.5]
	Female	58% (58/100)		57% (57/100)		24% (24/100)		10% (10/100)	
Socioeconomic status	Low	66.2% (104/157)	0.18; 1.4 [0.8 – 2.4]	63.7% (100/157)	0.23; 1.4 [0.8 – 2.4]	36.3% (57/157)	<b>&lt;0.001;</b> <b>3.2 [1.6 – 6.1]</b>	10.8% (17/157)	0.83; 1.1 [0.5 – 2.6]
	High	57.6% (53/92)		55.4% (51/92)		15.2% (14/92)		9.8% (9/92)	
Contact with animals	Yes	36.8% (7/19)	<b>0.01; 0.3</b> <b>[0.1 – 0.8]</b>	57.9% (11/19)	0.80; 0.9 [0.3 – 2.3]	15.8% (3/19)	0.20; 0.4 [0.1 – 1.6]	15.8% (3/19)	0.43; 1.7 [0.5 – 6.2]
	No	65.2% (150/230)		60.9% (140/230)		29.6% (68/230)		10% (23/230)	
Raw fruit and vegetable consumption	Yes	64.6% (126/195)	0.33; 1.4 [0.7 – 2.5]	62.1% (121/195)	0.39; 1.3 [0.7 – 2.4]	32.3% (63/195)	<b>0.01; 2.7</b> <b>[1.2 – 6.2]</b>	9.7% (19/195)	0.49; 0.7 [0.3 – 1.8]
	No	57.4% (31/54)		55.6% (30/54)		14.8% (8/54)		13% (7/54)	
Treated water supply in household	Yes	58.3% (35/60)	0.38; 0.8 [0.4 – 1.4]	56.7% (34/60)	0.47; 0.8 [0.4 – 1.5]	13.3% (8/60)	<b>0.003;</b> <b>0.3 [0.1 – 0.7]</b>	13.3% (8/60)	0.40; 1.5 [0.6 – 3.6]
	No	64.6% (122/189)		61.9% (117/189)		33.3% (63/189)		9.5% (18/189)	
Members of the same household with gastrointestinal symptoms	Yes	72.8% (56/77)	<b>0.03; 1.9</b> <b>[1.0 – 3.4]</b>	72.8% (56/77)	<b>0.01; 2.2</b> <b>[1.2 – 3.9]</b>	51.9% (40/77)	<b>&lt;0.001;</b> <b>4.9 [2.7 – 8.9]</b>	14.3% (11/77)	0.18; 1.7 [0.8 – 4.0]

## RESULTATS

	<b>No</b>	58.7% (101/172)		55.2% (95/172)		18% (31/172)		8.7% (15/172)	
<b>Digestive symptoms</b>	<b>Yes</b>	68.8% (86/125)	0.06; 1.6 [0.9 – 2.7]	64% (80/125)	0.27; 1.3 [0.8 – 2.2]	42.4% (53/125)	<b>&lt;0.001;</b> 4.3 [2.8 – 8.0]	15.2% (19/125)	<b>0.01;</b> <b>3.0 [1.2 – 7.4]</b>
	<b>No</b>	57.3% (71/124)		57.3% (71/124)		14.5% (18/124)		5.6% (7/124)	
<b>Abdominal pain</b>	<b>Yes</b>	71.1% (81/114)	<b>0.02; 1.9</b> <b>[1.1 – 3.2]</b>	65.8% (75/114)	0.13; 1.5 [0.9 – 2.5]	44.7% (51/114)	<b>&lt;0.001;</b> <b>4.7 [2.6 – 8.5]</b>	13.2% (15/114)	0.20; 1.7 [0.8 – 3.9]
	<b>No</b>	56.3% (76/135)		56.3% (76/135)		14.8% (20/135)		8.1% (11/135)	
<b>Diarrhea</b>	<b>Yes</b>	71.4% (45/63)	0.11; 1.7 [0.9 – 3.1]	60.3% (38/63)	0.95; 1.0 [0.5 – 1.8]	42.9% (27/63)	<b>0.004;</b> <b>2.4 [1.3 – 4.4]</b>	22.2% (14/63)	<b>&lt;0.001;</b> <b>1.7 [0.8 – 3.9]</b>
	<b>No</b>	60.2% (112/186)		60.8% (113/186)		23.7% (44/186)		6.5% (12/186)	
<b>Fever</b>	<b>Yes</b>	46.2% (6/13)	0.24; 0.5 [0.2 – 1.5]	53.8% (7/13)	0.61; 0.7 [0.2 – 2.3]	46.2% (6/13)	0.2; 2.3 [0.7 – 7.0]	38.5% (5/13)	<b>0.006;</b> <b>6.4 [1.9 – 21.3]</b>
	<b>No</b>	64% (151/236)		61% (144/236)		27.5% (65/236)		8.9% (21/236)	
<b>Vomiting</b>	<b>Yes</b>	63% (17/27)	0.99; 1.0 [0.4 – 2.3]	59.3% (16/27)	0.88; 0.9 [0.4 – 2.1]	37% (10/27)	0.37; 1.6 [0.7 – 3.6]	14.8% (4/27)	0.50; 1.6 [0.5 – 5.0]
	<b>No</b>	63.1% (140/222)		60.8% (135/222)		27.5% (61/222)		9.9% (22/222)	

\*: Diagnosis by molecular biology (nested PCR and real-time PCR)

# RESULTATS

## II-. Enquête épidémiologique dans une population d'enfants au Sénégal

*Préambule* : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal « *BMC Infectious Diseases* ».

### a. Introduction

L'infection à *Blastocystis* sp. étant grandement liée au péril fécal, il est logique de suggérer que la prévalence de ce parasite doit être importante dans les pays où les conditions sanitaires sont précaires. Or, la plupart des pays africains rencontrent des problèmes majeurs en termes d'hygiène et d'accès à l'eau potable. Pourtant, les données épidémiologiques concernant *Blastocystis* sp. sur le continent africain restent limitées et principalement focalisées sur les pays d'Afrique du Nord. Dans le but de combler ce manque d'information et de pouvoir évaluer l'impact de cette parasitose, une étude épidémiologique a été menée pour la première fois au Sénégal sur une cohorte de 93 enfants de 6 à 10 ans vivant dans le district rural de Podor. Cette enquête a été réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche Biomédicale Espoir pour la Santé de Saint Louis au Sénégal dans le cadre du projet « AnoPalAnoVac ». Pour chaque enfant, un questionnaire standard (**Annexe IV**) a été complété afin de savoir, en particulier, s'ils présentaient des symptômes gastro-intestinaux.

### b. Résultats

El Safadi D., Gaayeb L., Meloni D., **Cian A.**, Poirier P., Wawrzyniak I., Delbac F., Dabboussi F., Delhaes L., Seck M., Hamze M., Riveau G., Viscogliosi E. (2014). Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis.* 14:164 (highly accessed)

### c. Conclusion

C'est à notre connaissance la première fois qu'une prévalence de *Blastocystis* sp. de 100% était observée dans une cohorte d'individus à travers le monde. Elle confirmait en particulier l'intérêt des méthodes de détection moléculaire du fait de leur sensibilité par rapport aux méthodes classique d'observation qui sous-estiment largement la prévalence du parasite. Comme dans une majorité de pays à travers le monde, le ST3 était prédominant dans cette étude suivi du ST1, du ST2 et du ST4. Cette distribution des STs était similaire à celle observée dans d'autres pays africains (Alfellani et al., 2013b) et confirmait la rareté ou

## RESULTATS

l'absence du ST4 sur ce continent. Les données cliniques recueillies pour chaque enfant couplées au sous typage des isolats indiquaient que le ST3 était largement majoritaire dans le groupe des enfants symptomatiques alors que les ST1 et ST2 présentaient des prévalences similaires dans les groupes des individus symptomatiques et asymptomatiques. En outre, plus de la moitié des enfants de notre cohorte souffraient de divers troubles digestifs pouvant être en lien avec une infection par *Blastocystis* sp. Cependant, il était extrêmement difficile de corréler ces symptômes à la seule présence de *Blastocystis* sp. car les autres agents infectieux pouvant être responsables de ces mêmes troubles digestifs n'avaient pas été recherchés. Or, au Sénégal, les parasites intestinaux (protozoaires et helminthes) représentent depuis longtemps un problème majeur de santé publique (Ndir et al., 2002). Quoiqu'il en soit, une telle prévalence de *Blastocystis* sp. pouvait probablement s'expliquer par de multiples sources d'infection qu'elles soient animales (zoonose) et environnementales (eau contaminée) couplées à une large transmission inter-humaine. De ce fait, il devient urgent pour les autorités sanitaires de prendre des mesures de prévention du risque d'infection (éducation, mesures d'hygiène individuelle et qualité de l'eau de consommation) afin de réduire l'impact de la blastocystose dans ce pays.

### **Ma contribution dans cette étude :**

- ✓ Gestion des échantillons
- ✓ Enregistrement des données cliniques
- ✓ Génotypage d'isolats de *Blastocystis* sp. et analyse des données de séquençage
- ✓ Lecture et correction du manuscrit

## RESULTATS

**Article 4: Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide**

**Dima El Safadi**<sup>1,2†</sup>

† Dima El Safadi and Lobna Gaayeb contributed equally to this work

Email: dima.elsafadi@hotmail.com

**Lobna Gaayeb**<sup>1,3†</sup>

† Dima El Safadi and Lobna Gaayeb contributed equally to this work

Email : lobna.gaayeb@gmail.com

**Dionigia Meloni**<sup>1,4</sup>

Email : dionigia.meloni@riken.jp

**Amandine Cian**<sup>1</sup>

Email : amandine.cian@gmail.com

**Philippe Poirier**<sup>5</sup>

Email: ppoirier@chu-clermontferrand.fr

**Ivan Wawrzyniak**<sup>5</sup>

Email: ivan.wawrzyniak@univ-bpclermont.fr

**Frédéric Delbac**<sup>5</sup>

Email: frederic.delbac@univ-bpclermont.fr

**Fouad Dabboussi**<sup>2</sup>

Email : fdaboussi@hotmail.com

**Laurence Delhaes**<sup>1</sup>

Email : laurence.delhaes@pasteur-lille.fr

**Modou Seck**<sup>3</sup>

Email : modou.seck@espoir-sante.org

**Monzer Hamze**<sup>2</sup>

Email : mhamze@monzerhamze.com

**Gilles Riveau**<sup>1,3</sup>

Email : gilles.riveau@gmail.com

**Eric Viscogliosi**<sup>1\*</sup>

\*Corresponding author

Email : eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

## RESULTATS



<sup>1</sup> Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, Lille, France

<sup>2</sup> Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, Laboratoire Microbiologie, Santé et Environnement, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

<sup>3</sup> Biomedical Research Center Espoir pour la Santé (CRB-EPLS), Saint-Louis, Senegal

<sup>4</sup> Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan

<sup>5</sup> Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, CNRS UMR 6023, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, Aubière, France

\* Correspondence: [eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr](mailto:eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr)

Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France



# RESULTATS

## Abstract

**Background:** *Blastocystis* sp. is currently the most common intestinal protist found in human feces and considered an emerging parasite with a worldwide distribution. Because of its potential impact in public health, we reinforced the picture of *Blastocystis* sp. prevalence and molecular subtype distribution in Africa by performing the first survey of this parasite in Senegal.

**Methods:** Stool samples from 93 symptomatic presenting with various gastrointestinal disorders or asymptomatic children living in three villages of the Senegal River Basin were tested for the presence of *Blastocystis* sp. by non-quantitative and quantitative PCR using primer pairs targeting the SSU rDNA gene. Positive samples were subtyped to investigate the frequency of *Blastocystis* sp. subtypes in our cohort and the distribution of subtypes in the symptomatic and asymptomatic groups of children.

**Results:** By the use of molecular tools, all 93 samples were found to be positive for *Blastocystis* sp. indicating a striking parasite prevalence of 100%. Mixed infections by two or three subtypes were identified in eight individuals. Among a total of 103 subtyped isolates, subtype 3 was most abundant (49.5%) followed by subtype 1 (28.2%), subtype 2 (20.4%) and subtype 4 (1.9%). Subtype 3 was dominant in the symptomatic group while subtypes 1 and 2 were detected with equal frequency in both symptomatic and asymptomatic groups. The distribution of subtypes was compared with those available in other African countries and worldwide. Comparison confirmed that subtype 4 is much less frequently detected or absent in Africa while it is commonly found in Europe. Potential sources of *Blastocystis* sp. infection including human-to-human, zoonotic, and waterborne transmissions were also discussed.

**Conclusions:** The prevalence of *Blastocystis* sp. in our Senegalese population was the highest prevalence ever recovered worldwide for this parasite by reaching 100%. All cases were caused by subtypes 1, 2, 3 and 4 with a predominance of subtype 3. More than half of the children infected by *Blastocystis* sp. presented various gastrointestinal disorders. Such high prevalence of blastocystosis in developing countries makes its control a real challenge for public health authorities.

**Keywords:** *Blastocystis* sp., Intestinal parasite, Molecular epidemiology, Pathogenicity, PCR, Subtyping, Transmission, Zoonosis

# RESULTATS

## Background

*Blastocystis* sp. is an anaerobic protist that inhabits the gastrointestinal tract of humans and many groups of animals [1-4]. This cosmopolitan enteric parasite with a worldwide distribution [5] is often identified as the most common unicellular eukaryote reported in human fecal samples [1]. Indeed, its prevalence may exceed 50% in developing countries [6,7] and reach 20% in industrialized countries [8,9]. These differences may be explained by poor sanitary conditions, close animal contact, and consumption of contaminated food or water [10-12]. Such prevalence also suggests large-scale human-to-human [13], waterborne, and zoonotic transmissions for *Blastocystis* sp. [14]. Numerous studies have demonstrated the resistance of cysts of the parasite in feces and environmental sources [15] highlighting the fecal-oral route as the main mode of transmission of *Blastocystis* sp. Moreover, a higher risk of infection has been identified in food and animal handlers, providing conclusive evidence on the transmission of the parasite between humans and animals [16,17].

At the morphological level, *Blastocystis* sp. isolates from humans and animals have been reported to be roughly indistinguishable [1]. However, extensive genetic diversity among *Blastocystis* sp. isolates has been reported based on the comparison of the small-subunit (SSU) rDNA gene sequence [18] leading to the classification of *Blastocystis* sp. isolates into subtypes (STs) [19]. To date, according to recent epidemiological surveys in human and animal populations, 17 STs have been identified [2] but it is highly likely that other STs remain yet to be uncovered. Among the 17 STs, nine of them have been detected in humans with a varying prevalence [5]. Indeed, only four of them are frequent (ST1, ST2, ST3 and ST4) and represent around 90% of the subtyped isolates. A majority of human infections with *Blastocystis* sp. is attributable to ST3 but the distribution of the four predominant STs may vary among the areas studied. Thereby, ST4 is almost as common as ST1 and ST3 in some European countries but seems rare or completely absent in Africa, Asia, and America [5,20]. The other STs that are common in animal hosts i.e. ST5 to ST9, are rarely found in humans and are most likely the result of zoonotic transmission.

As *Blastocystis* sp. can be found in both symptomatic and asymptomatic patients its clinical relevance remained uncertain [1]. However, a converging bundle of recent *in vivo*, *in vitro* and genomic data strongly suggests that this microorganism may be pathogen [21-24] and allows proposing a model for pathogenesis of this parasite [25] particularly involving virulence factors as cysteine proteases [26,27]. Therefore, *Blastocystis* sp. should be associated with a variety of non-specific gastrointestinal disorders including diarrhea,

## RESULTATS

abdominal pain, nausea and vomiting [1,22] and also suspected to be linked to irritable bowel syndrome (IBS) [25,28] and chronic or acute urticarial lesions [29,30]. In addition, *Blastocystis* sp. has increasingly been implicated in diarrheal illness in immunocompromised individuals including HIV/AIDS and cancer patients and transplant recipients [31,32].

It has long been suggested that the pathogenesis of *Blastocystis* sp. may be dependent upon ST but recent epidemiological data remain contradictory [8,29,33-36]. Nevertheless, the likely pathogenic power of *Blastocystis* sp. coupled to its high prevalence in the human population raise crucial questions about its current burden in public health. Consequently, information on the prevalence of the parasite and the distribution of STs are starting to emerge in still poorly studied geographic areas as Africa. To date the available data concern only few African countries of the North and West such as Egypt [21,37,38], Libya, Nigeria, and Liberia [5] and one Eastern African country, Tanzania [39]. Therefore, the aim of the present study was to reinforce the picture of *Blastocystis* sp. prevalence and ST distribution in Africa by performing the first survey of this parasite in Senegal. In this epidemiological study, we described the prevalence of *Blastocystis* sp. infection and ST distribution in a cohort of Senegalese children living in 3 rural villages in close contact with animals and with poor or no access to clean water and sanitation. The distribution of *Blastocystis* sp. STs in both asymptomatic and symptomatic individuals was investigated together with potential risk factors for transmission of the parasite.

### Methods

#### Cohort and collection of samples

This work has been carried out as part of the “SchistoVAN” project (clinicaltrials.gov ID NCT01553552), sponsored by the Biomedical Research Centre EPLS (Saint-Louis, Senegal) (www.espoir-sante.org). The present study was approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health of Senegal (September 2011; protocol number SEN11/43, clinicaltrials.gov: NCT01553552). Oral and written informed consents were obtained from the parents or the legal guardians of the children in accordance with the Code of Ethics of the World Medical association (Declaration of Helsinki). Children enrolled in the present study formed a sub-cohort of the “AnoPalAnoVac” project (clinicaltrials.gov ID NCT01545115) and were recruited on the basis of their age (6 to 10 years of age in October 2011) through village nurses, healthcare workers in the community and school directors. Date of birth was ascertained from vaccination cards or school register. A standardized questionnaire was completed for each child (see supplementary material). In particular, children were asked

## RESULTATS

about each gastrointestinal symptom individually including abdominal pain, diarrhea, and vomiting. This cross-sectional study was conducted in October 2011, in 3 villages of the Podor district located in northern Senegal: Agniam Towguel (16°32'N-14°48'W; total population (TP): 989; several temporary ponds, traditional housing, irrigated crops), Fanaye Diery (16°32'N-15°13'W; TP: 6781; animal husbandry, irrigated crops, some urbanized habitat), and Niandane (16°35'N-14°59'W; TP: 5100; rice and banana farming, irrigated crops, some urbanized habitat, no access to running water). In this region, the climate is Sahelian, with annual rainfall between July and September. Mean temperature ranges between 20°C and 30°C during the cool season (November to February) and between 25°C and 38°C during the warm season (March to October). In this study, stool samples were collected from 93 symptomatic and asymptomatic children (Agniam = 17; Fanaye = 38; Niandane = 38) presenting or not gastrointestinal disorders. These boys (n = 46) and girls (n = 47) were aged 6 to 10 years (median age 8.4; quartiles: 6.6; 9.5) (Table 1). Children presented no symptoms of severe illness and/or fever and were subject to a questionnaire that was designed to collect clinical data especially regarding recent diarrhea, vomiting, and abdominal pain. For storage and transport at -20°C to Lille, stool samples were added in Stool Transport and Recovery (S.T.A.R.) buffer (Roche) in a ratio of 1:3 according to the manufacturer's recommendations then homogenized by shaking.

### **DNA extraction and molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates**

Samples stored in S.T.A.R. buffer were stirred and then centrifuged for 1 min at 1,000 g. Total genomic DNA was extracted from 200 µl of the cleared stool supernatant using the QiaAMP DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For each sample, 5 µl of extracted DNA was submitted to non-quantitative Polymerase Chain Reactions (non-qPCRs) as previously described using two independent pairs of *Blastocystis* sp.-specific primers designed by Scicluna et al. [40] and Poirier et al. [20], both targeting the small subunit (SSU) rDNA coding region. The respective 600 bp- and 320 bp-amplified domains have been shown to contain sufficient information for accurate subtyping of *Blastocystis* sp. isolates [20,40]. Non-qPCR amplifications were carried out in 50 µl according to standard conditions for Platinum *Taq* High-Fidelity DNA polymerase (Invitrogen). For each DNA sample, the non-qPCR product with the highest intensity on agarose gel was purified and sequenced. Direct sequencing of few non-qPCR products generated mixed signals that could reflect infections by different STs or was of poor quality probably due to a too small amount of parasite DNA matrix. Because of the difficulty in

## RESULTATS

interpreting the corresponding DNA sequencing chromatograms, same samples were re-analyzed by non-qPCRs and positive bands of the expected sizes were purified and cloned as previously described [41]. Three positive clones containing inserts were arbitrarily selected for each sample and sequenced on both strands. The DNA samples negative by non-qPCRs were subsequently amplified using the real time qPCR assay developed by Poirier et al. [20]. Due to the high sensitivity of this detection method, various controls were performed to prevent artifacts related to contamination through different sources: DNA extraction controls (isolation of DNAs without stool and from a *Blastocystis* sp.-negative stool) subsequently used in qPCR assays and negative (DNA matrix replaced by water) and positive (DNA obtained from a *Blastocystis* sp. ST4 culture) qPCR controls. The expected 320 bp-amplified variable region of the SSU rRNA gene was directly sequenced for subtyping. The SSU rRNA gene sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers KF848509 to KF848624. Obtained sequences were compared with all *Blastocystis* sp. SSU rRNA gene sequences available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST program. STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known *Blastocystis* sp. STs according to the updated classification by Alfellani et al. [2].

### Results and discussion

#### Screening for *Blastocystis* sp. in a cohort of Senegalese children using molecular methods

In this study, fecal samples were collected from 93 children, 46 boys and 47 girls, aged 6 to 10 years and living in 3 villages situated in the north of Senegal. This cohort consisted of two groups: one symptomatic composed of 54 children presenting variously with abdominal pain, vomiting, and diarrhea and one asymptomatic including 39 other children (Table 1). All 93 samples were screened for *Blastocystis* sp. by non-qPCR and qPCR methods using specific primer pairs amplifying distinct domains of the SSU rDNA coding region [20,40]. Non-qPCR products were directly sequenced or subsequently cloned whether the resulting sequence chromatogram showed double or poor quality signals. In the latter case that involved 32 samples, three positive clones containing inserts were arbitrarily selected and sequenced. Overall, 71 samples were identified as positive for *Blastocystis* sp. by non-qPCR methods. The remaining 22 samples negative by non-qPCR nevertheless proved to be positive for the parasite by qPCR. Thereby, by means of these different molecular approaches, *Blastocystis* sp. was recognized in 100% of stool samples of this Senegalese population. To our knowledge this represents the highest prevalence ever recovered worldwide for this parasite.

## RESULTATS

In almost all molecular epidemiological studies conducted to date, only one nucleic acid-based diagnostics methodology was used to identify and subtype *Blastocystis* sp. isolates in stool samples. Briefly, PCR screening of fecal samples can be achieved using ST-specific sequence-tagged-site (STS) primers or genus-specific primers with subsequent sequencing for ST identification. Several regions in the SSU rDNA gene have been proposed by different authors for sequencing [24] but the “barcode” region designed by Scicluna et al. [40] has been extensively used as in the present study. Advantages and limitations of these two PCR approaches were recently largely discussed [24,42] and a comparative study using both techniques recommended barcoding as the relevant method for *Blastocystis* sp. diagnosis and subtyping [43]. However, as confirmed from our data, direct sequencing of non-qPCR products may be unsuccessful in the case of mixed infections with more than one *Blastocystis* sp. ST in the same sample. Therefore subtyping of isolates in mixed infections requires cloning of the non-qPCR product and sequencing of several clones as previously suggested [44]. In addition, about 24% of the samples have not been diagnosed as positive for *Blastocystis* sp. by non-qPCR methods in our study. Hence, at this stage of our screening, the prevalence of the parasite was 74%, which greatly underestimated its true prevalence as determined in a second step by qPCR (100%). Consequently, our study confirmed the impact of detection methods to ascertain the actual prevalence of *Blastocystis* sp. in human populations and the interest and higher sensitivity of qPCR assays in comparison to non-qPCR methods for epidemiological surveys.

Although the prevalence of *Blastocystis* sp. never reached 100% in any cohort studied so far, it was described as very high in some developing countries specially, in children. By using non-molecular standard methods, the prevalence of the parasite already exceeded 40% in communities in Venezuela [45], Peru [46], Colombia [7], and in school children or orphanage in Indonesia [6], Thailand [47], and Lebanon (El Safadi unpubl.). Moreover, the prevalence of *Blastocystis* sp. was around 60% in immigrants in the city of Naples (southern Italy) who came for a large majority from northern and western African countries [48]. In Libya, the prevalence of the parasite has been previously reported close to 30% [49]. In Senegal, although the prevalence of *Blastocystis* sp. had never been determined before, intestinal parasites (protozoa and helminths) represent for a long time a major public health problem. Indeed, the global prevalence of intestinal parasites in children ranged from 32% to 84% depending on the study areas [50-53]. Such impact of intestinal parasites previously reported in the Senegalese population is clearly in accordance with the pattern found for *Blastocystis* sp. in the current study.

## RESULTATS

### **Distribution of *Blastocystis* sp. STs in the Senegalese population and comparison with other African countries**

In all the children, the expected SSU rDNA domains targeted by non-qPCR and qPCR methods were amplified and successfully sequenced. Each of the new SSU rDNA gene sequences obtained in this study showed very high similarity (98% to 100%) to homologous sequences of the other *Blastocystis* sp. isolates reported so far. The comparison with representative sequences of all known *Blastocystis* sp. STs allowed the direct subtyping of the new isolates (Table 1). As stated above, for 32 of the 93 samples, cloning of the non-qPCR product was necessary for subtyping and 3 positive clones were arbitrarily selected and sequenced. For 14 of these 32 samples, the three sequenced clones were identical (Table 1). For 10 other samples presenting infection by a single ST, clones showed 1 to 14 nucleotide differences between them. As previously suggested [40,41], these nucleotide differences may reflect either coinfection with two isolates of the same ST or sequence variations between SSU rDNA gene copies within the same isolate [23]. Interestingly, the higher number of nucleotide difference between the clones (11 to 14) was observed in children infected by ST3. Recently, by analyzing and comparing respectively SSU rDNA sequences or data from multilocus sequence typing, Meloni et al. [44] and Stensvold et al. [54] revealed substantial intra-ST diversity in ST3 and more limited intra-ST2 and intra-ST4 variations. In either case, we have considered in the following analysis of our data that two different clones of the same ST identified in the same patient derived from the same isolate of *Blastocystis* sp. For the last 8 samples, mixed infections with two (6 samples) or three STs (2 samples) were identified (Table 2). The majority of the subtyped samples included in the present study (85/93) represented single infections. With the addition of 8 mixed infections consisting of two or three different isolates, we analyzed a total of 103 isolates. As summarized in Table 3, ST3 was the most common *Blastocystis* sp. ST in our Senegalese population (49.5%) followed by ST1 (28.2%), ST2 (20.4%) and ST4 (1.9%). The distribution of STs was almost similar between the three villages with a majority of infections attributable to ST3. The only significant difference was that ST1 followed at position 2 in Niandiane and Agniam Towguel and at position 3 in Fanaye Diery.

The distribution of *Blastocystis* sp. STs in Senegal is quite similar to that observed in a majority of countries all over the world with a predominance of ST3 followed by ST1 then ST2 or ST4 [5]. If we focused on the studies previously conducted in Africa, the only available reports concerned the ST distribution in Egypt [21,37,38], Libya, Nigeria, Liberia [2], and Tanzania [39], the latter survey only including 6 isolates (Figure 1). Globally, ST1,

## RESULTATS

ST2, and ST3 represent around 82% of all 369 African isolates subtyped so far including those of the present study. ST3 is highly prevalent in African countries with an average of 46% of the 369 isolates. Consequently, because ST3 is rarely found in animals, a large-scale human-to-human transmission might likely explain the predominance of this ST in African countries as also in the rest of the world. Three studies conducted in different cities in Egypt and that in Liberia have identified ST3 as the predominant ST, as was true for our study population. However ST1 was detected with the highest frequency in Libya and Nigeria, and ST2 in Tanzania. Since ST1 and ST2 are frequently found in various animal groups including livestock [2,4,55], it can be hypothesized that a not yet evaluated proportion of human infections by both STs are of zoonotic origin. Interestingly ST4 was not detected in the studies reported in Egypt, Libya and Tanzania and its prevalence is quite low in Senegal (1.9%). Although ST4 was relatively frequent in Liberia (12%) and Nigeria (14%), these data confirmed that ST4 is much less frequently detected or absent in Africa while it is commonly found in Europe [5,34]. However, the reasons for the heterogeneous geographical distribution of ST4 remain unknown and its reservoir hosts have to be clarified. Additional STs including ST6 and ST7 were commonly found only in two studies carried out in Egypt [21,38]. Indeed, these STs were not detected in Senegal, Liberia, Nigeria, and Tanzania as in a third survey in Egypt [37] and only one isolate belonging to ST7 was identified in Libya. Both STs are usually hosted by birds (avian STs) [56] and rarely found in mammals. This was confirmed in the present study. Given their apparent host specificity, it is highly likely that human infections by avian STs are of zoonotic origin.

The prevalence of mixed ST infections was 8.6% (8/93 samples) in our Senegalese cohort. This percentage is probably underestimated but roughly similar to that calculated (6%) by taking into account subtyped isolates from all epidemiological studies published to date (191 of 3171 samples) and listed by Alfellani et al. [5]. Mixed ST infections were found in all three villages of our study but with different proportions. In Agniam Towguel, only one mixed infection by 3 STs was found (ST1/ST2/ST3) (5.9%) while 4 mixed infections by 2 or 3 STs (10.5%) (ST2/ST3, ST3/ST4 and ST1/ST2/ST3) were recorded in Fanaye Diery. Regarding Niandane, 3 mixed infections by 2 STs (7.9%) were identified (ST1/ST2, ST1/ST4, and ST2/ST3) (Table 2). Mixed infections mostly corresponded to ST1, ST2, and ST3 isolates and were more likely to occur considering the high prevalence of each of these STs in our cohort. Curiously, the only two ST4 isolates of our study were identified in the context of mixed infections and not as part of single infections.



## RESULTATS

### **Distribution of *Blastocystis* sp. STs in symptomatic and asymptomatic groups**

According to recent epidemiological reports, links between ST and pathogenicity are still matter of debate [8,29,33-36,41]. To highlight a possible relationship between ST and major intestinal symptoms associated with *Blastocystis* sp. infection (diarrhea, vomiting, and abdominal pain), the ST distribution was evaluated in our cohort of 93 symptomatic or asymptomatic children. Interestingly, the majority of children infected by *Blastocystis* sp. (54/93 or 58%) presented various gastrointestinal disorders as previously observed in a pediatric unit in Turkey [57]. In the following analysis, symptomatic (6) and asymptomatic (2) children presenting mixed infections by two or three STs were removed. Thereby the remaining 48 isolates from symptomatic children and 37 isolates from asymptomatic children were considered (Table 4). The most dominant ST in both groups was ST3, and 63% of the ST3 isolates were found in symptomatic individuals. Predominance or high prevalence of ST3 in symptomatic groups of patients was also shown for instance in France [41], Australia [8], Turkey [57,58], and Iran [35]. Regarding ST1 and ST2 isolates, both STs were detected with equal frequency in the symptomatic and asymptomatic groups of our cohort (Chi square test,  $p=0.845$ ). However, ST1 was over-represented in groups of symptomatic individuals in previous epidemiological studies in China [59], Turkey [60], Iran [35], Egypt [21], and Lebanon [36]. Moreover, ST1 was the most prevalent ST in some cohorts presenting with IBS [38,61] and was shown to be pathogenic in rat models of blastocystosis [21]. In contrast, ST2 was not usually overrepresented in groups of symptomatic patients from different countries and Dogruman-Al et al. [57] suggested that ST2 was a non-pathogenic ST. However, in our study, the proportion of ST2 isolates in symptomatic patients was far from negligible. Moreover, all ST2 isolates identified in French and Australian sampling were from symptomatic individuals [8,41]. To complete our observations, it can also be underlined that the only two ST4 isolates found in our study were associated with symptoms but in the context of mixed ST infections (associated to ST1 or ST3). Therefore, the pathogenic potential of ST4 could not be assessed from our epidemiological data. However, a high prevalence of ST4 was recently found in Danish patients presenting with acute diarrhea [33] and Spanish symptomatic individuals [62]. Globally, no association between ST and symptom status was statistically significant from our present data.

### **Potential risk factors for transmission of *Blastocystis* sp. within the Senegalese cohort**

The fecal-oral route is the main mode of transmission of *Blastocystis* sp. like the other common gastrointestinal parasites [1]. To reach a prevalence of 100% as in the present study,

## RESULTATS

it is reasonable to argue that infection of Senegalese children by the parasite occurred through multiple transmission sources. Although we did not had the opportunity to collect and analyze environmental (mainly water samples) and animal samples, it appears clear that individuals living in small communities in a rural area with modest socio-economic status (average income of 0.5 \$ per person per day in these Senegalese villages), poor hygiene sanitation, close contact with domestic animals and livestock, and water supply directly from well and river as in our study greatly increase their risks of infection by *Blastocystis* sp. Indeed, recent studies have revealed a human-to-human transmission coupled with a high prevalence of the parasite in a close community of girls in Thailand [13] as well as in a rural village in Nepal [14] whose description and environment (animals reared in or next to villager dwellings and rivers as water sources of the community) are quite similar to those of Senegalese villages. In this context, zoonotic transmission of *Blastocystis* sp. would be another significant source of infection due to the wide range of animals potentially infected with the parasite and in close contact with humans [2,4,55,56]. However the impact of this mode of transmission through contact with contaminated animal fecal materials coupled with poor hand hygiene of villagers remains difficult to quantify therefore that it involves STs frequently found in humans (ST1 to ST4) as in the present study. Finally, there is a concern that water should be a main source of infection by *Blastocystis* sp. although large-scale waterborne outbreaks involving the parasite have not yet been documented. Ability of *Blastocystis* sp. cysts, the only transmissible stage of this parasite to survive for long periods of time in the environment together with their low size [1,15] represent some factors that favor waterborne transmission of the parasite. In 2006, *Blastocystis* sp. has also been added by the World Health Organization to the list of waterborne parasites [63]. *Blastocystis* sp. was previously reported in drinking water, rivers, tanks, and sewage samples [11,12,14,15,64]. Interestingly, in these latter studies, the same STs were identified in both the water samples and the stools of consumers providing evidence for water transmission. In the Senegalese villages of the present study, river and wells represent the main water sources for drinking and cooking purposes as well as for bathing of the population. Consequently, water sources of this community potentially contaminated with human and animal feces, may largely facilitate transmission of *Blastocystis* sp. and should be considered as serious potential threats to consumers. Further, the analysis of fecal samples from animals living in or near the Senegalese villages and of water samples would help to confirm their epidemiological importance as sources of infection and contamination for inhabitants.

# RESULTATS

## **Conclusions**

To our knowledge, this is the first investigation of prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in Senegal that, moreover, greatly expands the few data available on molecular epidemiology of this parasite in Africa. In this country, the prevalence of *Blastocystis* sp. in a cohort of children living in a rural area reached a peak of 100% never achieved before. Such high prevalence may reflect different exposure of individuals to animal (zoonosis) and environmental (waterborne) sources of infection together with large-scale human-to-human transmission. This study also raises questions about the real pathogenicity of *Blastocystis* sp. since more than half of children infected by this parasite presented various gastrointestinal symptoms and highlights the socioeconomic impact of blastocystosis in developing countries with low environmental conditions and quality of life. Finally, this epidemiological survey provides necessary information to public health authorities for urgently setting prevention (water quality assessments and primary education of dwellers regarding the modes of transmission) and control programs that should help to reduce the burden of *Blastocystis* sp.

## **List of abbreviations**

ST, subtype; IBS, Irritable Bowel Syndrome

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Authors' contributions**

LG and MS collected stools and patient data and helped in drafting the manuscript. DES, DM, AC, PP and IW collected and analyzed PCR and sequence data and helped in drafting the manuscript. EV, GR, MH, LD, FDe and FDa conceived, designed and coordinated the study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques from the University of Lille 2, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur of Lille and the Biomedical Research Center EPLS (Sn). DES and MO were both supported by PhD fellowships from the Conseil National de la Recherche Scientifique and the Azm & Saade Association from Lebanon, DM by a PhD fellowship from the Regione Autonoma della Sardegna and a post-doctoral grant from the Japanese Society for Promotion of Science (JSPS)

## RESULTATS

and AC by a PhD fellowship from the Ministère Français de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

### References

1. Tan KS: **New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**:639–665.
2. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG: **Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals.** *Protist* 2013, **164**:497–509.
3. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, Levecke B, Tannich E, Clark CG, Stensvold CR: **Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates.** *Parasitology* 2013, **140**:966–971.
4. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J: **Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from South Wales, Australia.** *Vet Parasitol* 2013, **196**:85–89.
5. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG: **Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications.** *Acta Trop* 2013, **126**:11–18.
6. Pegelow K, Gross R, Pietrzik K, Lukito W, Richards AL, Fryauff DJ: **Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997, **28**:173–190.
7. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR: ***Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia.** *Infect Genet Evol* 2013, doi:pii: S1567-1348(13)00286-4. 10.1016/j.meegid.2013.07.020. [Epub ahead of print].
8. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J: **Subtype distribution of *Blastocystis* isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of *Blastocystis*.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013, **32**:335–343.
9. Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, Goorhuis A, van Gool T: **Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands.** *BMC Infect Dis* 2013, **13**:389.
10. Li LH, Zhou XN, Du ZW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, Yoshikawa H, Steinmann P, Utzinger J, Wu Z, Chen JX, Chen SH, Zhang L: **Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China.** *Parasitol Int* 2007, **56**:281–286.

## RESULTATS

11. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M: **Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **79**:401–406.
12. Eroglu F, Koltas IS: **Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method.** *Parasitol Res* 2010, **107**:841–845.
13. Thathaisong U, Siripattanapipong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-ariya P, Naaglor T, Leelayoova S: **Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the home for girls, Bangkok, Thailand.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **88**:352-358.
14. Lee LL, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK: ***Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility?** *Parasit Vectors* 2012, **5**:130.
15. Suresh K, Smith H, Tan T: **Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:5619–5620.
16. Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, Kanbara H: **Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal.** *Vet Parasitol* 2009, **160**:295–300.
17. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC: **Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers.** *Vet Parasitol* 2010, **169**:8–17.
18. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E: **Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:348–355.
19. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG: **Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus.** *Trends Parasitol* 2007, **23**:93–96.
20. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El AH, Delbac F, Livrelli V: **Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**:975–983.
21. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM: **Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* egyptian isolates in experimentally infected rats.** *Parasitol Res* 2008, **102**:853–860.

## RESULTATS

22. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, Wu B, MacAry PA: **Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp.** *Curr Infect Dis Rep* 2010, **12**:28–35.
23. Denoeud F, Roussel M, Noël B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armamet C, Couloux A, Poulain J, Segurans B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KSW, Antigenave F, Jaillon O, Aury J, Delbac F, Wincker P, Vivarès CP, El Alaoui H: **Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite.** *Genome Biol* 2011, **12**:R29.
24. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR: **Recent developments in *Blastocystis* research.** *Adv Parasitol* 2013, **82**:1–32.
25. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El AH: **New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002545.
26. Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW: **Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases.** *Cell Microbiol* 2012, **14**:1474–1484.
27. Wawrzyniak I, Texier C, Poirier P, Viscogliosi E, Tan KS, Delbac F, El Alaoui H: **Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite.** *Parasitol Int* 2012, **61**:437–442.
28. Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS: **Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection.** *Parasit Vectors* 2008, **1**:40.
29. Vogelberg C, Stensvold CR, Monecke S, Ditzgen A, Stopsack K, Heinrich-Grafe U, Pohlmann C: ***Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms.** *Parasitol Int* 2010, **59**:469–471.
30. Verma R, Delfanian K: ***Blastocystis hominis* associated acute urticaria.** *Am J Med Sci* 2013, **346**:80–81.
31. Tan TC, Ong SC, Suresh KG: **Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients.** *Parasitol Res* 2009, **105**:1283–1286.
32. Batista MW, Pierrotti LC, Abdala E, Clemente WT, Girao ES, Rosa DRT, Ianhez LE, Bonazzi PR, Lima AS, Fernandes PFCBC, Padua-Neto MV, Bacchella T, Oliveira APP, Viana CFG, Ferreira MS, Shikanai-Yasuda MA: **Endemic and opportunistic infections in Brazilian solid organ transplant recipients.** *Trop Med Int Health* 2011, **16**:1134–1142.

## RESULTATS

33. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, Nielsen HV: ***Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **84**:883-885.
34. Forsell J, Granlund M, Stensvold CR, Clark CG, Evengard B: **Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, **31**:1689–1696.
35. Moosavi A, Haghghi A, Nazemalhosseini Mojarad E, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, Zali MR: **Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran.** *Parasitol Res* 2012, **111**:2311–2315.
36. El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, Wawrzyniak I, Delbac F, El Alaoui H, Delhaes L, Dei-Cas E, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E: **Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **88**:1203–1206.
37. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El Alaoui H, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E: **Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt.** *Parasitol Res* 2010, **106**:505–511.
38. Fouad SA, Basyoni MM, Fahmy RA, Kobaisi MH : **The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome.** *Arab J Gastroenterol* 2011, **12**:194–200.
39. Petrasova J, Uzlikova M, Kostka M, Petrzelkova KJ, Huffman MA, Modry D: **Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania.** *Int J Parasitol* 2011, **41**:1113–1120.
40. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG: **DNA barcoding of *Blastocystis*.** *Protist* 2006, **157**:77–85.
41. Souppart L, Sancier G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E: **Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France.** *Parasitol Res* 2009, **105**:413–421.
42. Stensvold CR: ***Blastocystis*: genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology.** *Trop Parasitol* 2013, **3**:26–34.
43. Stensvold CR: **Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**:190–194.

## RESULTATS

44. Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noël C, Gantois N, Wawrzyniak I, Delbac F, Chabé M, Delhaes L, Dei-Cas E, Fiori PL, El Alaoui H, Viscogliosi E: **Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp.** *Parasitol Int* 2012, **61**:719–722.
45. Velasco J, Gonzalez F, Diaz T, Pena-Guillen J, Araque M: **Profiles of enteropathogens in asymptomatic children from indigenous communities of Merida, Venezuela.** *J Infect Dev Ctries* 2011, **5**:276–285.
46. Machicado JD, Marcos LA, Tello R, Canales M, Terashima A, Gotuzzo E: **Diagnosis of soil-transmitted helminthiasis in an Amazonic community in Peru using multiple diagnostic techniques.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012, **106**:333–339.
47. Saksirisampant W, Nuchprayoon S, Wiwanitkit V, Yenthakam S, Ampavasiri A: **Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Patum Thani province.** *J Med Assoc Thai* 2003, **86**:S263–S270.
48. Gualdieri L, Rinaldi L, Petrullo L, Morgoglione ME, Maurelli MP, Musella V, Piemonte M, Caravano L, Coppola MG, Cringoli G: **Intestinal parasites in immigrants in the city of Naples (southern Italy).** *Acta Tropica* 2011, **117**:196–201.
49. Alfellani MA, Khan AH, Al-Gazaoui RM, Zaid MK, Al-Ferjani MA: **Prevalence and clinical features of *Blastocystis hominis* infection among patients in Sebha, Libya.** *Sultan Qaboos Univ Med J* 2007, **7**:35–40.
50. Faye O, Ndir O, Dieng T, Gaye O, Bah IB, Dieng Y, Faye I, Diallo S: **Cryptosporidiosis among intestinal parasitosis in Senegalese pediatric hospital patients.** *Dakar Med* 1993, **38**:129–132.
51. Gaye O, Ndir O, Kane A, Belmachi R, Ndiaye M, Diouf M, Diedhiou M, Diallo S: **Intestinal parasitic diseases and tinea of the scalp in Dakar school population: influence of environmental factors on the infestation level.** *Dakar Med* 1994, **39**:57–61.
52. Salem G, van de Velden L, Laloé F, Maire B, Ponton A, Traissac P, Prost A: **Intestinal parasitic diseases and environment in Sahelo-Sudanese towns : the case of Pikine (Senegal).** *Rev Epidemiol Santé Publique* 1994, **42**:322–333.
53. Ndir I, Gaye A, Sy M, Gaye O, Ndir O: **Prevalence of intestinal parasites at the King Baudouin health center of Guediawaye (Senegal).** *Dakar Med* 2002, **47**:168–171.
54. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG: **Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes.** *Infect Genet Evol* 2012, **12**:263–273.

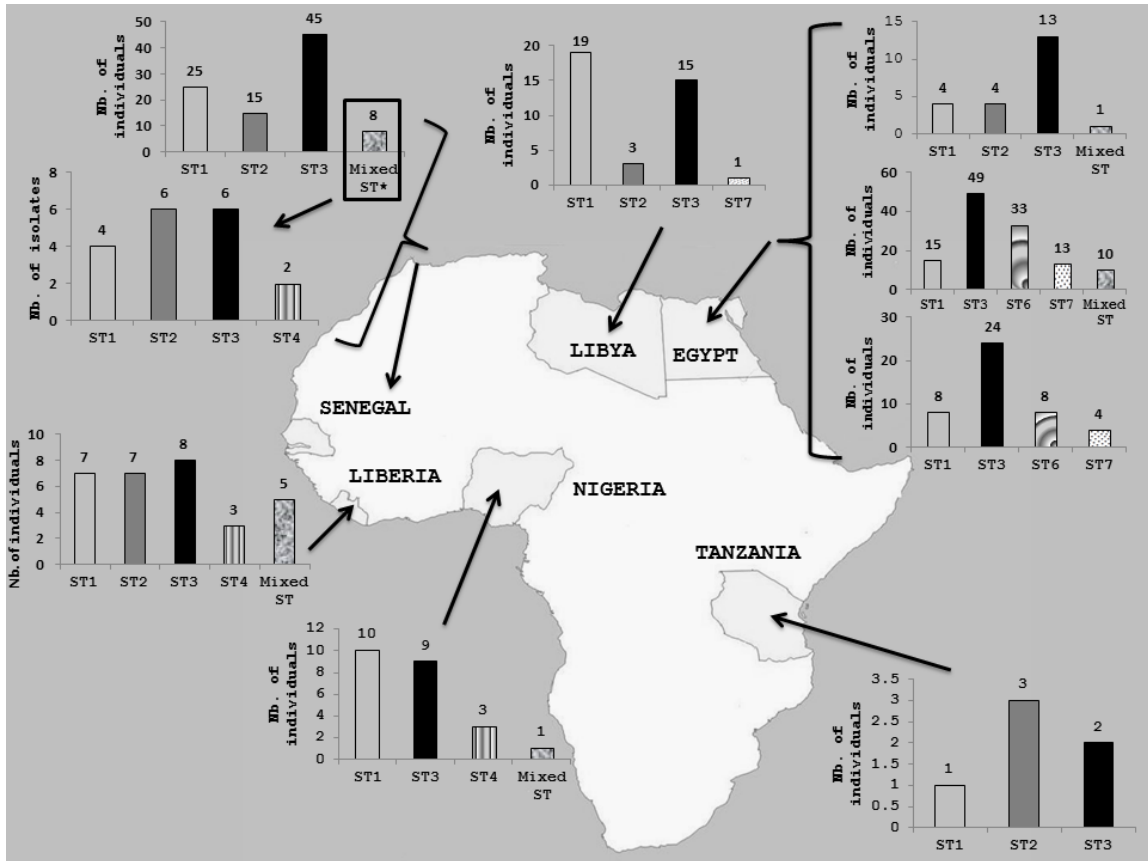


## RESULTATS

55. Tian CT, Tan PC, Sharma R, Sugnaseelan S, Suresh KG: **Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia.** *Parasitol Res* 2013, **112**:85–89.
56. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG: **Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype.** *Int J Parasitol* 2009, **39**:473–479.
57. Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt Ö, Demirel M: **A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*.** *Parasitol Res* 2008, **103**:685–689.
58. Özyurt M, Kurt Ö, Molbak K, Nielsen HV, Haznedaroglu T, Stensvold CR: **Molecular epidemiology of *Blastocystis* infection in Turkey.** *Parasitol Int* 2008, **57**:300–306.
59. Li J, Deng T, Li X, Cao G, Li X, Yan Y: **A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections.** *Parasitol Res* 2013, **112**:3537–3541.
60. Eroglu F, Gene A, Elgun K, Koltas IS: **Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR.** *Parasitol Res* 2009, **105**:1589–1592.
61. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R: **Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*.** *Parasitol Res* 2010, **106**:1033–1038.
62. Dominguez-Marquez MV, Guna R, Munoz C, Gomez-Munoz MT, Borrás R: **High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain).** *Parasitol Res* 2009, **105**:949–955.
63. World Health Organization: **Microbial fact sheets.** In *World Health Organization Guidelines for Drinking Water quality (WHOGDWQ)*. 4th Edition. Malta: Gutenberg; 2011:271–273.
64. Leelayoova S, Rangsin R, Taamasri P, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin. **Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**:658–662.

# RESULTATS

Figure 1. Distribution of *Blastocystis* sp. STs across African countries. In the case of Senegal, distribution of STs in mixed infections indicated by an asterisk in the histogram was detailed.



## RESULTATS

**Table 1 Clinical data and *Blastocystis* sp. STs among symptomatic and asymptomatic patients in Senegal**

<b>Patients</b>	<b>Sex/age</b>	<b>Symptoms</b>	<b><i>Blastocystis</i> sp. ST by non-qPCR<sup>a</sup></b>	<b>Nucleotide differences<sup>b</sup></b>	<b><i>Blastocystis</i> sp. ST by qPCR</b>	<b>Accession no.</b>
<b>DSS1</b>	M/6.2	Abdominal pain			1	KF848509
<b>DSS2</b>	F/5.9	Abdominal pain Diarrhea	3 (Sc)	0		KF848510
<b>DSS3</b>	M/6.8		3 (Sc)			KF848511
<b>DSS4</b>	F/6.1	Abdominal pain Vomiting	1 (Sc)			KF848512
<b>DSS5</b>	M/8.3				3	KF848513
<b>DSS6</b>	M/7.3	Abdominal pain Diarrhea	1 (Sc)			KF848514
<b>DSS7</b>	F/5.9				3	KF848515
<b>DSS8</b>	M/6.8	Abdominal pain Vomiting	1 (Sc)			KF848516
<b>DSS9</b>	F/9.2	Abdominal pain			3	KF848517
<b>DSS10</b>	M/9.7	Vomiting	3 (Sc)	0		KF848518
<b>DSS11</b>	F/10	Diarrhea Vomiting	3 (Sc)			KF848519
<b>DSS12</b>	M/8.8	Abdominal pain Vomiting			3	KF848520
<b>DSS13</b>	F/8.6	Abdominal pain	1 (Sc)			KF848521
<b>DSS14</b>	M/7		2 (Sc)	0		KF848522
<b>DSS15</b>	F/7.7		2 (Sc)			KF848523
<b>DSS16</b>	M/6.9				3	KF848524
<b>DSS17</b>	F/7.7				3	KF848525
<b>DSS18</b>	F/6.1		3 (Sc)	0 to14		KF848526-7
<b>DSS19</b>	M/8.7				2	KF848528
<b>DSS20</b>	M/9.7	Abdominal pain	2 (Sc)			KF848529
<b>DSS21</b>	F/6	Abdominal pain	1 (Sc)			KF848530
<b>DSS22</b>	M/10.1	Abdominal pain	3 (Sc)			KF848531
<b>DSS23</b>	M/7.7		Mixed 2 and 3 (P)	0		KF848532-3
<b>DSS24</b>	F/6.4		1 (Sc)			KF848534
<b>DSS25</b>	F/9.6	Abdominal	Mixed 3 and 4	0 to 4		KF848535-7

## RESULTATS

<b>DSS26</b>	F/6.5	pain Abdominal pain	(Sc) Mixed 1, 2 and 3(Sc)		KF848538-40
<b>DSS27</b>	M/7.2		3 (Sc)		KF848541
<b>DSS28</b>	M/8		3 (Sc)		KF848542
<b>DSS29</b>	F/7.3			2	KF848543
<b>DSS30</b>	M/5.8	Abdominal pain		1	KF848544
<b>DSS31</b>	F/8.6	Abdominal pain	2 (Sc)		KF848545
<b>DSS32</b>	M/6.6		3 (Sc)		KF848546
<b>DSS33</b>	M/7.7	Abdominal pain	Mixed 2 and 3 (Sc)	0	KF848547-8
<b>DSS34</b>	M/9.5	Vomiting	3 (Sc)		KF848549
<b>DSS35</b>	M/7.7	Abdominal pain	3 (Sc)	0	KF848550
<b>DSS36</b>	F/5.9	Abdominal pain	3 (Sc)		KF848551
<b>DSS37</b>	M/7.4		2 (Sc)	0	KF848552
<b>DSS38</b>	F/9.7	Abdominal pain Diarrhea Vomiting	1 (Sc)	0	KF848553
<b>DSS39</b>	F/9.8	Abdominal pain		3	KF848554
<b>DSS40</b>	F/9.9	Abdominal pain Diarrhea Vomiting	2 (Sc)		KF848555
<b>DSS41</b>	F/9.7	Vomiting	3 (Sc)	0	KF848556
<b>DSS42</b>	F/10.2	Abdominal pain Diarrhea	1 (Sc)		KF848557
<b>DSS43</b>	M/9.3		2 (Sc)		KF848558
<b>DSS44</b>	M/10	Abdominal pain	3 (Sc)		KF848559
<b>DSS45</b>	F/8.9	Abdominal pain	3 (Sc)	0 to 14	KF848560-1
<b>DSS46</b>	F/10.2	Abdominal pain		3	KF848562
<b>DSS47</b>	F/10		3 (Sc)	0	KF848563
<b>DSS48</b>	M/9.8		3 (Sc)	0	KF848564
<b>DSS49</b>	F/10		2 (Sc)		KF848565
<b>DSS50</b>	F/10.2			1	KF848566
<b>DSS51</b>	M/9.4		1 (Sc)		KF848567
<b>DSS52</b>	M/9	Abdominal pain	1 (Sc)		KF848568
<b>DSS53</b>	F/8.1		1 (Sc)		KF848569
<b>DSS54</b>	M/8.5		Mixed 1 and 2	0	KF848570-1

# RESULTATS

			(Sc)		
<b>DSS55</b>	M/9.1	Abdominal pain	3 (Sc)		KF848572
<b>DSS56</b>	F/8.6		1 (Sc)		KF848573
<b>DSS57</b>	F/9.7	Abdominal pain	2 (Sc)		KF848574
<b>DSS58</b>	M/9.3	Abdominal pain	2 (Sc)		KF848575
<b>DSS59</b>	M/8.9	Abdominal pain	3 (Sc)		KF848576
<b>DSS60</b>	F/8.8		3 (Sc)		KF848577
<b>DSS61</b>	M/9.9			1	KF848578
<b>DSS62</b>	F/9.5	Abdominal pain		1	KF848579
<b>DSS63</b>	M/8.5	Abdominal pain	1 (Sc)		KF848580
<b>DSS64</b>	M/6.2	Abdominal pain	3 (Sc)		KF848581
<b>DSS65</b>	M/9.8		1 (Sc)		KF848582
<b>DSS66</b>	F/9.9	Abdominal pain	2 (Sc)		KF848583
<b>DSS67</b>	F/6.1	Abdominal pain	Mixed (Sc)	1 and 4 0	KF848584-5
<b>DSS68</b>	F/6.1		1 (Sc)	0	KF848586
<b>DSS69</b>	F/6.8			1	KF848587
<b>DSS70</b>	F/7.8	Abdominal pain	3 (Sc)		KF848588
<b>DSS71</b>	F/6.7	Abdominal pain		3	KF848589
<b>DSS72</b>	M/6	Abdominal pain	3 (Sc)		KF848590
<b>DSS73</b>	F/7	Vomiting Abdominal pain	3 (Sc)	0	KF848591
<b>DSS74</b>	M/8.5			3	KF848592
<b>DSS75</b>	M/5.9	Abdominal pain		3	KF848593
<b>DSS76</b>	M/8.1	Abdominal pain		1	KF848594
<b>DSS77</b>	M/6.6	Abdominal pain	3 (Sc)	2 to 12	KF848595-7
<b>DSS78</b>	M/6.9	Abdominal pain		2	KF848598
<b>DSS79</b>	M/8.4		3 (Sc)	0 to 11	KF848599-600
<b>DSS80</b>	M/6.1			3	KF848601
<b>DSS81</b>	F/5.9	Abdominal pain	Mixed (Sc)	2 and 3 0	KF848602-3
<b>DSS82</b>	F/9.8	Abdominal pain	3 (Sc)	0	KF848604

## RESULTATS

<b>DSS83</b>	M/6.4				1	KF848605
<b>DSS84</b>	F/9.2		2 (Sc)			KF848606
<b>DSS85</b>	F/6.8	Abdominal pain Vomiting	3 (P)	3 to 5		KF848607-9
<b>DSS86</b>	F/6.6	Abdominal pain	Mixed 1, 2 and 3 (P)			KF848610-2
<b>DSS87</b>	M/9.9	Abdominal pain	3 (P)	0		KF848613
<b>DSS88</b>	M/9.5		1 (P)	0 to 1		KF848614-5
<b>DSS89</b>	F/9.1	Diarrhea	3 (P)	0		KF848616
<b>DSS90</b>	F/9.5		3 (P)	0 to 1		KF848617-8
<b>DSS91</b>	F/9.4		1 (P)	0 to 3		KF848619-20
<b>DSS92</b>	F/6.1	Abdominal pain Diarrhea	3 (P)	0 to 3		KF848621-2
<b>DSS93</b>	M/6		3(P)	0 to 1		KF84623-4

<sup>a</sup>According to the standard terminology including 17 STs [2]; (Sc) and (P): non qPCRs using the primer pair described by Scicluna et al. [40] and Poirier et al. [20], respectively.

<sup>b</sup>Determined in the common region of clones belonging to the same ST and sequenced for each sample

## RESULTATS

**Table 2 Single and mixed ST infections with *Blastocystis* sp. identified in the Senegalese cohort**

Villages	<i>Blastocystis</i> sp. STs								Total no.
	ST1	ST2	ST3	ST1/ST2	ST1/ST4	ST2/ST3	ST3/ST4	ST1/ST2/ST3	
Agniam Towguel	5	2	9	0	0	0	0	1	17
Niandane	13	5	17	1	1	1	0	0	38
Fanaye Diery	7	8	19	0	0	2	1	1	38
<b>Total no.</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>45</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>93</b>

**Table 3 *Blastocystis* sp. ST distribution among Senegalese villages**

Villages	<i>Blastocystis</i> sp. STs (%)				Total no.
	ST1	ST2	ST3	ST4	
Agniam Towguel	6	3	10	0	19
Niandane	15	7	18	1	41
Fanaye Diery	8	11	23	1	43
<b>Total no. (%)</b>	<b>29 (28.1)</b>	<b>21 (20.3)</b>	<b>51 (49.5)</b>	<b>2 (1.9)</b>	<b>103</b>

**Table 4 Distribution of *Blastocystis* sp. STs among symptomatic and asymptomatic children groups**

Group	<i>Blastocystis</i> sp. STs (%)				Total no.
	ST1	ST2	ST3	Mixed infections	
Symptomatic	13 (24)	7 (13)	28 (52)	6 (11)	54
Asymptomatic	12 (31)	8 (20)	17 (44)	2 (5)	39
<b>Total no (%)</b>	<b>25 (27)</b>	<b>15 (16)</b>	<b>45 (48)</b>	<b>8 (9)</b>	<b>93</b>

# RESULTATS

## III-. Enquête épidémiologique dans la population française

*Préambule* : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal «*BMC Infectious Diseases*».

### a. Introduction

Comme pour la plupart des parasites intestinaux, la transmission de *Blastocystis* sp. est directement liée au péril fécal et de ce fait, la prévalence de ce parasite est forte dans les pays en voie de développement. Cependant, ce péril ne peut être négligé dans les pays développés avec les voyages fréquents de leurs populations dans les pays à risque et l'accroissement des flux migratoires en provenance de ces mêmes pays. Ainsi, Bart et al. (2013) ont montré que la prévalence de *Blastocystis* sp. atteignait 38% dans le département de Médecine Tropicale de l'Academic Medical Center d'Amsterdam qui reçoit en consultation des patients de retour de voyages dans des pays tropicaux. Or, la prévalence du parasite n'est « que » de 18% en moyenne dans les autres services de consultation du même hôpital. De plus, une étude menée en Italie montrait une différence significative entre la prévalence du parasite chez les personnes de nationalité italienne (6%) et celles vivant en Italie mais nées pour la plupart dans des pays en voie de développement et donc à risque (14,1%) (Masucci et al., 2011). La même année, Gualdieri et al. (2011) mentionnaient une prévalence de *Blastocystis* sp. de 52,7% chez des migrants originaires essentiellement d'Afrique et d'Asie. Curieusement, malgré ces signaux d'alarme, très peu d'enquêtes épidémiologiques ont été menées en Europe concernant *Blastocystis* sp. comme peut en témoigner notre synthèse présentée dans le Tableau de l'Article 1. En France, seules deux études avaient été menées en 1999 et en 2007 et indiquaient une prévalence de *Blastocystis* sp. respectivement de 3 et 6,1% par examen microscopique des selles (Pinel et al., 1999 ; Bourée, 2007). Cette prévalence montait à 14,5% dans une étude menée à Clermont-Ferrand en utilisant la PCR en temps réel comme méthode de détection (Poirier et al., 2011). En ce qui concerne la distribution des STs, deux études menées en France sur des cohortes incluant un nombre restreint d'échantillons s'étaient montrées contradictoires. En effet, le ST3 était prédominant à Lille (Souppart et al., 2009) alors le ST4 était majoritaire à Clermont Ferrand (Poirier et al., 2011). Aussi, pour avoir une vision plus claire de la situation du parasite en France et plus globalement en Europe, une large enquête multi-centrique a été menée en collaboration avec 11 centres hospitaliers répartis sur l'ensemble du territoire français. En parallèle, et comme pour les études épidémiologiques précédentes, les données des patients ont été collectées dans un questionnaire standardisé (**Annexe V**) afin d'identifier d'éventuels facteurs de risque d'infection.



# RESULTATS

## b. Résultats

Cian A.\*, El Safadi D.\*, Nourrisson C., Pereira B., Morelle C., Bastien P., Bellanger A.P., Botterel B., Candolfi E., Desoubieux G., Lachaud L., Morio F., Pomares C., Rabodonirina M., Wawrzyniak I., Delbac F., Gantois N., Certad G., Delhaes L., Poirier P., Viscogliosi E. 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis* 16(1):451

\*Co-premiers auteurs

## c. Conclusion

Cette étude réalisée en collaboration avec 11 centres hospitaliers français était à notre connaissance la première étude multi-centrique menée en Europe sur *Blastocystis* sp. et avait en outre l'intérêt de fournir des données épidémiologiques dans plusieurs régions françaises. D'ailleurs, de larges variations ont été observées entre ces régions en termes de prévalence et de distribution des STs du parasite suggérant différents réservoirs et sources de transmission qui restent à identifier. Globalement, la prévalence de *Blastocystis* sp. en France atteignait 18,1% ce qui est loin d'être négligeable et finalement du même ordre de grandeur que celle observée aux Pays-Bas (Bart et al., 2013) avec la même méthode d'identification. Notre étude avait aussi montré un fort effet saisonnier avec une prévalence significativement plus élevée en été qu'en hiver ce qui pouvait aisément s'expliquer par différents facteurs de risque en été. D'autres facteurs de risque furent identifiés comme les voyages récents et l'âge. L'infection à *Blastocystis* sp. était aussi significativement associée aux douleurs abdominales. Concernant la distribution des STs, elle était similaire à celle observée dans la plupart des pays à travers le monde avec une prédominance du ST3 suivi des ST1 et ST2. Le ST4 était aussi fortement représenté confirmant ainsi sa prévalence importante sur le continent européen. Enfin, aucune association ne fut mise en évidence entre le ST et les symptômes cliniques.

### Ma contribution dans cette étude :

- ✓ Participation à la mise en place de l'étude
- ✓ Gestion des échantillons
- ✓ Enregistrement des données pour les analyses statistiques
- ✓ Génotypage des isolats de *Blastocystis* sp. et analyse des données de séquençage
- ✓ Participation à la rédaction de l'article

## **Article 5: Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France**

**Dima El Safadi**<sup>1¶</sup>

¶ Dima El Safadi and Amandine Cian contributed equally to this work

Email : dima.elsafadi@hotmail.com

**Amandine Cian**<sup>1¶</sup>

¶ Dima El Safadi and Amandine Cian contributed equally to this work

Email : amandine.cian@pasteur-lille.fr

**Céline Nourrisson**<sup>2,3</sup>

Email : c\_nourrisson@chu-clermontferrand.fr

**Bruno Pereira**<sup>4</sup>

Email : bpereira@chu-clermontferrand.fr

**Christelle Morelle**<sup>5</sup>

Email : christelle.morelle@univ-montp1.fr

**Patrick Bastien**<sup>5</sup>

Email : p-bastien@chu-montpellier.fr

**Anne-Pauline Bellanger**<sup>6</sup>

Email : apbellanger@chu-besancon.fr

**Françoise Botterel**<sup>7</sup>

Email : francoise.botterel@hmn.aphp.fr

**Ermanno Candolfi**<sup>8</sup>

Email : candolfi@unistra.fr

**Guillaume Desoubeaux**<sup>9</sup>

Email : guillaume.desoubeaux@univ-tours.fr

**Laurence Lachaud**<sup>10</sup>

Email : laurence.LACHAUD@chu-nimes.fr

**Florent Morio**<sup>11</sup>

Email : Florent.MORIO@chu-nantes.fr

**Christelle Pomares**<sup>12</sup>

Email : pomares.c@chu-nice.fr

**Meja Rabodonirina**<sup>13</sup>

Email : meja.rabodonirina@chu-lyon.fr

**Ivan Wawrzyniak**<sup>3</sup>

## RESULTATS

Email : ivan.wawrzyniak@univ-bpclermont.fr

**Frédéric Delbac<sup>3</sup>**

Email : Frederic.DELBAC@univ-bpclermont.fr

**Nausicaa Gantois<sup>1</sup>**

Email : Nausicaa.Gantois@pasteur-lille.fr

**Gabriela Certad<sup>1</sup>**

Email : Gabriela.Certad@pasteur-lille.fr

**Laurence Delhaes<sup>1,14</sup>**

Email : laurence.delhaes@gmail.com

**Philippe Poirier<sup>2,3\*</sup>**

\* Corresponding author (equal contributor)

Email : ppoirier@chu-clermontferrand.fr

**Eric Viscogliosi<sup>1\*</sup>**

\* Corresponding author (equal contributor)

eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

<sup>1</sup> Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, Lille, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Gabriel-Montpied, Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal-Université d’Auvergne - CNRS UMR 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> CHU Clermont-Ferrand, Unité de Biostatistiques, Direction de la Recherche Clinique (DRCI), Clermont-Ferrand, France

<sup>5</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Montpellier, CNRS UMR 5290 / IRD 224 / UM1, Université de Montpellier 1, Montpellier, France

<sup>6</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Besançon, Besançon, France

<sup>7</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

<sup>8</sup> Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, Université de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>9</sup> Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, CHU de Tours/CEPR Inserm U1100 Equipe 3, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

<sup>10</sup> Département de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes, Université de Montpellier I, CHU de Montpellier, Montpellier, France

## RESULTATS



<sup>11</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, EA1155-IICiMed, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>12</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU de Nice, C3M INSERM U1065, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France

<sup>13</sup> Service de Parasitologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>14</sup> Département de Parasitologie-Mycologie, CHU de Lille, Faculté de Médecine, Lille, France

\* Correspondence: [eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr](mailto:eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr)

Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France

# RESULTATS

## Abstract

**Background:** *Blastocystis* sp. is the most common intestinal parasite of humans. Despite its potential public health impact, epidemiological data regarding the prevalence and molecular subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Europe are rarely reported. Therefore, the first multi-center epidemiological survey performed in Europe was conducted in France to diagnose and subtype *Blastocystis* sp. and to identify risk factors for infection.

**Methods:** Stool samples from 788 patients were collected either in summer or winter in 11 hospitals throughout France together with patient data. All stool samples were tested for the presence of *Blastocystis* sp. by quantitative PCR targeting the SSU rDNA gene. Positive samples were sequenced to determine the distribution of the subtypes in our cohort. Statistical analyses were performed to identify potential risk factors for infection.

**Results:** Using quantitative PCR, the overall prevalence of *Blastocystis* sp. was shown to reach 18.1%. The prevalence was significantly higher in summer (23.2%) than in winter (13.7%). Travellers or subjects infected with other enteric parasites were significantly more infected by *Blastocystis* sp. than non-travellers or subjects free of other enteric parasites, respectively. Different age-related epidemiological patterns were also highlighted from our data. The prevalence of *Blastocystis* sp. was not significantly higher in patients with digestive symptoms or diagnosed with chronic bowel diseases. Among symptomatic patients, *Blastocystis* sp. infection was significantly associated with abdominal pain. Gender, socioeconomic status, and immune status were not identified as potential risk factors associated with infection. Among a total of 141 subtyped isolates, subtype 3 was predominant (43.3%), followed by subtype 1 and subtype 4 (20%), subtype 2 (12.8%), subtype 6 and subtype 7 (2.1%). No association between ST and clinical symptoms was statistically evidenced.

**Conclusions:** A high prevalence of *Blastocystis* sp. infection was found in our French patient population. Seasonal impact on the prevalence of *Blastocystis* sp. was highlighted and recent travels and age were identified as main risk factors for infection. Most cases were caused by subtypes 1 to 4, with a predominance of subtype 3. Large variations in both prevalence and ST distribution between hospitals were also observed, suggesting distinct reservoirs and transmission sources of the parasite.

**Keywords:** *Blastocystis* sp., Intestinal parasite, Molecular epidemiology, PCR, Subtyping, Risk factors for infection

# RESULTATS

## Background

*Blastocystis* sp. is a common protozoan intestinal parasite with worldwide distribution that inhabits the digestive tract of humans and a large variety of animal hosts [1-3]. In numerous epidemiological surveys, this cosmopolitan enteric parasite was frequently identified as the most common unicellular eukaryote found in human fecal samples [1,2,4]. Indeed, its prevalence may reach 20% in industrialized countries, including the European population [5] and 50% in developing countries [6]. Recently, the prevalence of *Blastocystis* sp. was shown to be 100% in a cohort of children living in a rural area in Senegal, highlighting the impact of blastocystosis mainly in developing countries with poor healthcare and hygiene [7]. In this regard, a higher prevalence of this parasite was found among European people with a history of recent travel to tropical countries [5]. At the morphological level, four major forms of *Blastocystis* sp. have been described, including the infective cyst which is able to survive for a long period in feces and environmental sources and is resilient to standard water chlorination, facilitating waterborne transmission of the parasite [1,8]. Therefore, the fecal-oral route is considered the main mode of transmission of *Blastocystis* sp. through the consumption of food or water contaminated by cysts.

Blastocystosis is usually diagnosed using direct-light microscopy of fecal smears or possibly short-term xenic *in vitro* culture of stool samples. However, these methods have a low diagnostic sensitivity compared with molecular tools, i.e. PCR assays, and could greatly underestimate the real prevalence of the parasite [9]. A remarkable genetic diversity has been revealed among *Blastocystis* sp. isolates from humans and other animals based on the comparison of small subunit (SSU) rRNA gene sequences. Consequently, seventeen lineages of so-called subtypes (ST1 to ST17) (arguably separate species) have been identified among mammalian and avian isolates [10], nine of which (ST1 to ST9) are found in humans with varying prevalence [2, 4]. The other STs (ST10-ST17) are exclusively found in animals [10]. Based on a recent review including all human samples subtyped thus far across various geographic regions worldwide [4], approximately 90% of human isolates belonged to ST1 to ST4, with a predominance of ST3 (around 60% of these isolates). Even though these four STs were found in different animal hosts, their predominance in the human population is likely explained by large-scale human-to-human transmission [1,2]. To our knowledge, ST9 was restricted to humans and until now has been identified in only 3 people from Denmark and Japan [4]. ST5 to ST8 supposedly of animal origin were rarely found in humans and their presence might be linked to zoonotic transmission. Besides, a higher risk of *Blastocystis* sp. infection was found in people with close animal contact, including zoo keepers [11].

## RESULTATS

The human health impact of *Blastocystis* sp. still remains uncertain because the parasite is frequently found in asymptomatic patients and has been associated with a wide range of non-specific symptoms including diarrhea, abdominal pain, bloating, nausea, and vomiting as well as urticarial lesions [1-3]. However, recent findings using *in vitro* and *in vivo* approaches combined with *in silico* analysis of genomic data and clinical reports strongly suggested the pathogenic potential of *Blastocystis* sp. by identifying putative virulence factors such as cysteine proteases. These proteases are secreted by the parasite and can induce epithelial barrier dysfunction [1-3,12-14]. The proposed models for pathogenesis of *Blastocystis* sp. [13-16] mainly involved adhesion of parasites to the intestinal epithelium, apoptosis and degradation of tight junction proteins of intestinal epithelial cells resulting in increased intestinal permeability, degradation of IgA and induction of a pro-inflammatory cytokine response. *Blastocystis* sp. was also recently associated with Irritable Bowel Syndrome (IBS) [16,17], a multifactorial functional bowel disorder partly explained by dysbiosis [18].

All these new data provide evidence that the public health burden of *Blastocystis* sp. continues to be underestimated, hence the interest in conducting large-scale epidemiological surveys in industrialized countries. In France, very little data were available concerning both the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. The parasite was previously reported in two French cohorts with a respective prevalence of 3.0% and 6.1% by direct-light microscopy of fecal smears [19,20]. In addition, conflicting ST distributions were observed between two French molecular studies conducted in different geographic areas and both including a limited number of samples [9,21]. Therefore, the aim of the present study was to reinforce the picture of *Blastocystis* sp. prevalence and molecular ST distribution in Europe by performing the first multi-center survey conducted in France from a large cohort of patients carried out between December 2012 and September 2013.

### Methods

#### Cohort of patients and collection of samples

This cross-sectional study was conducted in France between December 2012 and September 2013 and involved the parasitology-mycology medical laboratories of 11 teaching hospitals (Besançon, Clermont-Ferrand, Créteil, Lille, Lyon, Montpellier, Nantes, Nice, Nîmes, Strasbourg and Tours) throughout France (Figure 1). As part of the study, each laboratory randomly selected 21 to 50 stool samples in both winter (from December 2012 to February 2013) and summer (from July 2013 to September 2013) to subsequently evaluate potential

## RESULTATS

seasonal variations in the prevalence (percentage of subjects infected) of the parasite. All these samples (1 sample per patient) were collected at each participating center during routine clinical procedures. A total of 788 subjects followed up for different pathologies, with/without gastrointestinal symptoms were enrolled in this study. A standardized questionnaire was designed to collect information about each participating subject (sex, age, profession, recent travels and destinations, exposure to pets) as well as clinical data especially regarding immune status, presence of digestive symptoms (diarrhea, vomiting, bloating, constipation, and abdominal pain), and diagnosis of IBS or IBD (Inflammatory Bowel Disease). In addition, the observation of intestinal protozoan parasites (*Blastocystis* sp., amoebas, trichomonads, diplomonads, apicomplexa), fungi (microsporidia), and helminths by direct-light microscopy of fecal smears was also recorded, as well as digestive diseases of bacterial origin. For each subject, about 500 mg of fresh stools was collected and then homogenized by shaking in 1.5 ml of Stool Transport and Recovery (S.T.A.R.) buffer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) (ratio 1:3 according to the manufacturer's recommendations). Samples were stored and then transported at -20°C to Lille for molecular screening and subtyping of *Blastocystis* sp.

### **DNA extraction**

Stool samples stored in the S.T.A.R. buffer were stirred and then centrifuged for 1 min at 1,000 xg. Total genomic DNA was extracted from 200 µL of the supernatant using the QiaAMP DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended procedures. The DNA was eluted in 100 µL of elution buffer (Qiagen) and stored at -20 °C until use.

### **Detection and molecular subtyping of *Blastocystis* sp.**

For each sample, 2 µL of extracted DNA was subjected to real-time quantitative PCR (qPCR) assay to detect and subtype *Blastocystis* sp. qPCR was carried out using the *Blastocystis*-specific primer pair BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAA-3') / BL18SR2PP (5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3') targeting the SSU rRNA coding region as previously described [9]. DNA extraction controls (isolation of DNAs without stool and from a *Blastocystis* sp.-negative stool) subsequently used in qPCR assays and positive (DNA obtained from *Blastocystis* sp. ST4 or ST7 cultures) and negative (DNA matrix replaced by water) qPCR controls were performed. qPCR product from each positive sample was purified and sequenced in both strands by Genoscreen (Lille, France) or Beckman Coulter Genomics (Essex, United Kingdom). The SSU rRNA gene sequences obtained in this study were



## RESULTATS

deposited in GenBank under accession numbers KU158944 to KU159084 (see Additional file 1). Obtained sequences were compared with all *Blastocystis* sp. homologous sequences available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known *Blastocystis* sp. STs. For two samples, sequence chromatograms analysis revealed the presence of double traces, suggesting mixed infection by different STs.

### **Statistical analysis**

All analyses were performed using the Stata statistical software (version 13, StataCorp, College Station, US). The categorical data were expressed as the number of patients and associated percentages, whereas the quantitative data were expressed as the mean and associated standard deviation according to the statistical distribution (assumption of normality studied using Shapiro-Wilk's test). Comparisons between independent groups were performed by Chi-square or Fisher's exact tests for categorical parameters and by Student's t or Mann-Whitney tests when t-test conditions were not respected (normality and homoscedasticity studied by the Fisher-Snedecor test) for quantitative variables. The multivariate analysis was performed by stepwise approach according to univariate results and clinical relevance. A random-effects logistic regression was applied to determine parameters associated with the prevalence of *Blastocystis* sp., taking into account between and within center variability. Results were reported as odds-ratio (noted OR) and 95% confidence intervals. P-values of 0.05 or below were considered significant (two-sided). Due to multiple comparisons, the type-I-error correction was considered when appropriate. So, the Marascuillo's procedure was performed after Chi-square test (for example prevalence of *Blastocystis* sp. among age groups).

### **Results**

#### **Analysis of the cohort**

Stool samples were collected from a total of 788 patients (Table 1). Among them, 417 were recruited during winter and 371 in summer. The sex ratio (M/F) was 1.37 and the age of the participants (7 missing data) was between 7 months and 95 years (mean age of  $45.7 \pm 21.3$  years). Epidemiological records revealed that 178 patients had a recent history of travel outside France (*i.e.* during the last 12 months). Regarding the immune statuses of the patients, 351 were immunocompetent and 378 were immunocompromised (59 missing data). Among immunocompromised patients, 58 were positive for *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)

## RESULTATS

infection, 95 received a solid organ transplant, 131 received immunosuppressive therapy, 65 received a bone marrow transplant, and 34 suffered from tumorigenic processes. Forty patients suffered from chronic intestinal disease with 25 subjects presenting IBD and 15 IBS. Among this cohort, 502 patients presented digestive symptoms, such as diarrhea (52.4%), abdominal pain (29.9%), bloating (6.7%), constipation (3.6%) and vomiting (3.3%), and 234 subjects were asymptomatic (52 missing data).

### Screening for *Blastocystis* sp. using qPCR

The overall prevalence of *Blastocystis* sp. was shown to be 18.1% (143/788) in our study using qPCR (Table 1). The sensitivity of direct-light microscopy of fecal smears was only 45.8% compared to the molecular method. All samples positive by microscopy were positive by the PCR assay. The overall prevalence determined by qPCR ranged from 10.0% (Clermont-Ferrand) to 41.2% (Lille) (Figure 1 and Table 1). The overall prevalence in summer was significantly higher than in winter (23.2% versus 13.7%,  $p < 0.001$ ) (Figure 1 and Table 1). The difference in prevalence between males (19.5%) and females (16.6%) was not significant ( $p = 0.29$ ). The mean age of *Blastocystis* sp.-infected patients was significantly lower when compared to the age in *Blastocystis* sp.-free subjects ( $43.0 \pm 21.1$  years versus  $48.9 \pm 21.1$  years; Student's t-test,  $p = 0.003$ ). Subgroup analysis (Figure 2) revealed that the prevalence of *Blastocystis* sp. was 26.3% among subjects aged 0-14 years (15/57), 22.2% in the group aged 15-49 years (74/333), and 13.6% in patients aged over 50 years (53/391). However, while the prevalence of *Blastocystis* sp. in children was higher, with a peak between 5-9 years (36%, Figure 2), the statistical analysis only confirmed that subjects aged 15 to 49 years showed a higher prevalence than subjects aged over 50 years ( $p = 0.01$ , Marascuillo procedure; see also Additional file 2)

Among all the patients, 70 were found to be infected with other enteric parasites, either protozoans or helminths (see Additional file 3). The prevalence of *Blastocystis* sp. reached 40% in those patients (28/70), compared to 16.2% in subjects not infected with other enteric parasites ( $p < 0.001$ ). Two additional patients presented bacterial infections with *Clostridium* and *Salmonella*, respectively.

Univariate and multivariate analyses highlighted that patients traveling during the last 12 months had a higher prevalence of *Blastocystis* sp. than non-travellers (27.5% versus 14.7%, univariate:  $p < 0.001$ , multivariate logistic model: OR= 1.90 [1.18 ; 3.05],  $p = 0.009$ ). A history of two or more travels during the previous year was associated with a higher prevalence, reaching 33.3% ( $p = 0.43$ ). Even though the travel destination was recorded

## RESULTATS

(Africa, South America, Asia, North America, Oceania, and Europe), no significant difference between destinations and the prevalence of *Blastocystis* sp. was identified.

The socioeconomic level of all subjects was also recorded, and different professional classes were distinguished, including students, workers, executives, the unemployed and pensioners. The prevalence of *Blastocystis* sp. was not significantly different between the different professional classes. Food handlers and pet owners did not show a significantly higher prevalence than other individuals (22.2% versus 18.8%,  $p=0.57$  and 21.9% versus 19.7%,  $p=0.61$ , respectively). The prevalence of *Blastocystis* sp. in immunocompromised subjects was significantly lower than in immunocompetent patients (12.4 % versus 24.2%,  $p<0.001$ ). Within immunocompromised subjects, patients presenting with HIV, solid organ transplants, immunosuppressive therapy, solid cancer, and bone marrow transplants were distinguished. Subgroup analyses confirmed that the prevalence of *Blastocystis* sp. was significantly lower in patients receiving immunosuppressive treatment (8.4%,  $p=0.001$ ) and with bone marrow transplant (7.7%,  $p=0.02$ ) but not significantly lower in the other subgroups. The prevalence of *Blastocystis* sp. in patients suffering from IBD and IBS was 12% and 20%, respectively, compared to 18.4% in patients without a history of chronic bowel diseases ( $p=0.41$  and  $p=0.88$ , respectively). Moreover, all IBS and IBD patients infected with *Blastocystis* sp. were not infected with other enteric parasites.

### ***Blastocystis* sp. infection and digestive symptoms**

The prevalence of *Blastocystis* sp. was not shown to be significantly higher in symptomatic patients (18.5%, 93/502) than in asymptomatic carriers (16.2%, 38/234). The digestive symptoms selected for the study were abdominal pain, bloating, diarrhea, constipation, and vomiting (Figure 3). Within subjects positive for the parasite and presenting digestive symptoms, *Blastocystis* sp. infection was significantly associated with abdominal pain (23.3% in patients with abdominal pain versus 15.7% in patients without abdominal pain,  $p=0.007$ ). However, the most frequent symptom observed in symptomatic carriers was bloating, even if its prevalence in *Blastocystis* sp.-infected patients compared to non-carriers was not significant (26.4% versus 17.1%,  $p=0.09$ ).

### **Distribution of *Blastocystis* sp. STs**

Among the 143 positive samples, 6 different STs were identified (ST1 to ST4, ST6 and ST7) (Table 1). Two patients had mixed infection (2/143, 1.4%). Among the 141 patients with a single ST, ST3 was predominant (n=61, 43.3%), followed by ST1 and ST4 (both n=28, 20.0%), ST2 (n=18, 12.8%), ST6 and ST7 (both n=3, 2.1%) (Tables 1 and 2). The distribution

## RESULTATS

of STs varied widely between the medical centers (Table 1), and no significant difference in the distribution of STs was found according to the season. Moreover, the distribution of STs between the symptomatic and asymptomatic groups of patients was almost similar. The genetic diversity among isolates belonging to the same ST was very low since 130/141 isolates (92.2%) belonging to the different STs identified in the present study showed 99% to 100% identity with homologous sequences available in databases for the same STs. Only 11 isolates belonging either to the ST1 or ST3 exhibited 96% to 98% identity with homologous sequences. Therefore, numerous sequences of isolates belonging to the same ST were similar or closely related to each other

### Discussion

Little data are available in the literature regarding the prevalence of *Blastocystis* sp. in France and more generally in European countries. In France, the first two studies reported a prevalence of 3% and 6.1% in two cohorts of 2,581 and 9,700 patients, respectively, by direct-light microscopy of fecal smears [19,20]. More recently, the prevalence of *Blastocystis* sp. reached 14.5% in a single-center study including 186 patients using a molecular assay [9]. Interestingly, this latter value is roughly similar to the prevalence of 18.1% reported in the current samples using the same qPCR assay. By comparison, the prevalence reported in a few other neighbouring countries was 24.2% in the Netherlands (n=442) [5], 23% in Denmark (n=93) [22], 7.1% in Italy (n=5,351) [23], 7% in Spain (n=8,313) [24], and 6.9% and 3.9% in the United Kingdom (n=1,390 and n=1,000, respectively) [25,26] (Table 3). However, a comparison of the prevalence obtained from these various European studies remains generally uninformative due to the differences in the composition of the cohorts of patients and especially in the diagnostic tools. Indeed, apart from the Dutch and Danish studies, which were conducted using molecular tools and showed a prevalence similar to that of our survey, all other European epidemiological studies were performed using direct-light microscopy or *in vitro* culture, both methods being shown to be less sensitive than PCR [9]. The present study confirms this observation, since direct-light microscopy showed only 45.8% sensitivity compared to the qPCR assay.

Within the French centers, the prevalence of *Blastocystis* sp. ranged from 6.7% to 41.2%. This variation may be naturally explained by differences in the composition of the respective cohorts from each center, but may also reflect differences in food habits and sources of drinking water in various geographic areas, which are also more or less rural and have different climate conditions. In future studies, the analysis of food and environmental

## RESULTATS

samples in these regions, and especially the control of water sources regarding the presence of *Blastocystis* sp., might help identifying potential primary reservoirs of transmission. A key finding of our study was the seasonal impact on the prevalence of *Blastocystis* sp., which reached 23.2% in summer compared to 13.7% in winter. Interestingly, this seasonal pattern, already described in previous epidemiological surveys [26-28], was observed in 9 of the 10 French centers providing samples during both winter and summer. In France, this difference may be explained by changes in food habits according to the seasons, with an increased consumption of vegetables and fruits, drinks with ice cubes and ice creams in summer. Common water-based recreational activities may also be involved, since human fecal contamination was clearly shown to be correlated with *Blastocystis* sp. load in recreational rivers, suggesting a greater risk of infection by the parasite in summer [28]. Moreover, frequent trips during the summer holidays and stays for instance in densely populated holiday centers could represent other risk factors for infection.

Among our overall population, gender was not identified as a potential risk factor associated with *Blastocystis* sp. infection, since the finding of a slightly higher prevalence of the parasite in males (19.5%) than in females (16.6%) was not statistically significant. By contrast, *Blastocystis* sp. showed a different age-related epidemiological pattern. The mean age was thus significantly lower in *Blastocystis* sp.-infected patients ( $43.0 \pm 21.1$  years) than in non-carriers of the infection ( $48.9 \pm 21.1$  years). In addition, the prevalence of *Blastocystis* sp. was significantly higher in subjects aged 15 to 49 years compared to those aged over 50 years (22.2% versus 16.6%). On the other side, the prevalence of *Blastocystis* sp. was also not significantly higher in the age group 0 to 14 years (26.3%) compared to older age classes, likely due to the too small number of children included in our study. Interestingly, an infection peak was shown between 5-9 years of age, suggesting that children in this age category might be more at risk for *Blastocystis* sp. infection. In this regard, previous studies reported peaking prevalence of the parasite among groups aged under 10 years [27,30-32]. Such a high rate may be due to inadequate toilet training and hygiene practices of school-children and cross-transmission through close personal contact. In a recent survey conducted in the Netherlands [5], a significantly higher prevalence of *Blastocystis* sp. was reported among patients with a history of recent travel, suggesting that trips to tropical and low-income countries may increase the risk of parasite infection. A similar conclusion was drawn from our study, since travel during the last 12 months was significantly associated with a higher prevalence of *Blastocystis* sp. (27.5% versus 14.7% for non-travellers). Interestingly, the prevalence of the parasite reached 33.3% in patients reporting at least two travels during the

## RESULTATS

last year in countries at risk. Travellers should therefore follow food and water hygiene recommendations to prevent infection by *Blastocystis* sp.

Intestinal parasitic infections are among the leading causes of morbidity and mortality in patients infected with HIV. Consequently, the *Blastocystis* sp. detection as a possible pathogenic agent among immunocompromised patients continues to be debated. In this regard, the prevalence of *Blastocystis* sp. was previously found to be significantly higher in immunocompromised HIV patients, most presenting with diarrhea, than in HIV-seronegative controls [33-35]. Strikingly, *Blastocystis* sp. was the most commonly occurring parasite among the protozoans searched for in HIV-infected individuals [33,34,36,37], with a prevalence reaching about 70% in Jakarta, Indonesia [36]. In addition, a statistically significant association was shown between infection with *Blastocystis* sp. and the presence of digestive disorders among severely immunocompromised HIV-positive patients (with CD4+ T-cell counts < 200/ $\mu$ L) [33]. The prevalence of the parasite was also shown to be negatively correlated with the CD4+ cell count [36] and was significantly higher in HIV patients without antiretroviral therapy than among HIV-positive patients with treatment [38]. In immunocompromised patients presenting haematological malignancies, *Blastocystis* sp. was more frequently associated with gastrointestinal symptoms than in non-immunocompromised symptomatic patients [39]. This contrasted with a more recent French survey showing no correlation between digestive symptoms and immune status in patients presenting similar pathology [9]. All-in-all, immunodepression seems to be a factor of primary importance in the infection and pathogenic role of *Blastocystis* sp. However, in the present study, the prevalence of the parasite in immunocompromised subjects was significantly lower than in immunocompetent individuals (12.4% versus 24.2%, respectively), especially in subgroups of patients receiving immunosuppressive therapy (8.4%) or with bone marrow transplants (7.7%). In our opinion, the controlled food diet recommended to these patients for the prevention of potential opportunistic infections along with antibiotic therapy such as metronidazole might have a negative impact on the prevalence of *Blastocystis* sp. In addition, a history of travel was shown above to be positively correlated with the prevalence of *Blastocystis* sp.. In fact, only 21.5% of immunocompromised patients reported having travelled during the last 12 months, compared to 35.4% of immunocompetent individuals.

To clarify the clinical relevance of *Blastocystis* sp, numerous studies were published related to the comparison of parasite prevalence between symptomatic and asymptomatic individuals [1-3]. If accumulating epidemiological studies suggested that *Blastocystis* sp. was associated with gastrointestinal disorders, numerous reports did not support this association.

## RESULTATS

From our overall population, the prevalence of *Blastocystis* sp. was not significantly different between symptomatic and asymptomatic patients, what does not however prejudice the pathogenicity of various isolates. Within the symptomatic group, abdominal pain was reported significantly more frequently in *Blastocystis* sp. carriers, in agreement with earlier studies recording abdominal pain as one of the most common symptoms of blastocystosis [1]. Bloating was also attributed to blastocystosis in various studies [1]. This symptom was most frequently identified in *Blastocystis* sp.-positive subjects of our cohort, but was not significantly associated with parasite infection.

The prevalence of the parasite in patients suffering from chronic bowel disorders was also investigated, since recent studies suggested an association between *Blastocystis* sp. and IBS [2,16], a functional bowel disorder with a prevalence ranging from 5% to 24% in industrialized countries [18]. Based on a systematic review of the literature and a meta-analysis including previous epidemiological studies in IBS cohorts, it was shown that IBS patients had a relative risk of 2.34 of being infected with *Blastocystis* sp. when compared to non-IBS subjects [17]. However, in our study, the prevalence of the parasite was not significantly higher in IBS patients (20%) compared to non-IBS subjects (18.5%). Since the diagnosis of IBS is still difficult and requires a specific visit to a gastroenterologist, some patients in our study may not have been diagnosed as positive for IBS, which could impact our results. In parallel, according to various studies, the prevalence of *Blastocystis* sp. in IBD patients was reported to be lower or higher than in non-IBD subjects, which probably depends on the type of IBD (mainly Crohn's disease or ulcerative colitis) [40,41]. In our study, the parasite was identified less frequently in IBD subgroups (12%), but not significantly less than in non-IBD patients (18.4%). Unfortunately, subgroups analyses from different types of IBD were not performed because of the small size of the IBD cohort.

As part of our study, a total of 141 *Blastocystis* sp. isolates were subtyped to evaluate the ST distribution within our French cohort. ST3 was the most common ST (43.3%), followed by ST1 and ST4 (20%), ST2 (12.8%), ST6 and ST7 (2.1%). This distribution is nearly similar to that observed in a majority of geographical areas all over the world, including European countries [5,22,42], with a predominance of ST3, followed by ST1, ST2 or ST4, highlighting large-scale inter-human transmission [2,4]. The identification of a few isolates in Lille, Lyon, Nantes, or Clermont-Ferrand belonging to ST6 or ST7 is most likely the result of zoonotic transmission, since both STs are considered avian STs [1-4,10]. The distribution of some STs in the overall human population showed significant geographical variations, especially in relation to the ST4 [2,4]. Our data thus confirmed that ST4 is

## RESULTATS

commonly found in Europe [5,22,42] and especially in France [9], and is much less frequently detected or absent in Africa, America and Asia. This observation might perhaps be explained by the recently proposed emergence of ST4 in the human population in Europe [2]. The ST distribution was also variable between different French centers, although ST3 was predominant in 8 of the 11 centers. In two previous studies conducted in France, ST3 was the most frequent ST in Lille [21], whereas ST4 showed a higher prevalence in Clermont-Ferrand [9], in agreement with our survey. These patterns in ST distribution, as well as in prevalence of the parasite between centers, suggest that reservoirs and/or sources of contamination may differ from any geographical area of France to another. Until now, and for different reasons, the epidemiological data remain contradictory regarding the correlation between ST and the pathogenesis of *Blastocystis* sp. [1,21]. In this regard, our study failed to provide any evidence for ST association with specific symptoms status.

### **Conclusions**

Our survey provides new insights into the epidemiology of *Blastocystis* sp. in industrialized countries through the first multi-center study conducted in France. Such a multi-center survey gives a more comprehensive view of the parasite situation in France, by obtaining data regarding the prevalence and ST distribution of the parasite in different geographical areas. From our overall data, age and a history of recent travel represent the principal reliable risk factors for acquiring this infection. A seasonal impact on the prevalence of *Blastocystis* sp. is also highlighted, with a higher prevalence in summer. Large variations observed in the prevalence and ST distribution of the parasite between French regions suggest various reservoirs and sources of transmission. Further studies in other European countries, with multi-center recruitment of patients, will clearly be required to establish a complete mapping of the prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. in this continent and to improve our understanding of the circulation of the parasite within the European population.

### **Declarations**

#### **List of abbreviations**

ST, subtype; IBS, Irritable Bowel Syndrome; IBD, Inflammatory Bowel Disease; real-time quantitative PCR, qPCR; odds-ratio, OR; *Human Immunodeficiency Virus*, HIV

### **Ethics approval and consent to participate**

The study was approved by the research ethics committee “Comité de Protection des Personnes Sud-Est 6” (France) with the reference number 2015/CE82, which decided that



## RESULTATS



informed consent from all subjects was not necessary as the experiments did not result in additional constraints for the patients. Patient data were collected anonymously (encoding the identity of patients). This study was conducted in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

### **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and materials**

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article (and its additional files).

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This work was supported by grants from the Programme Orientations Stratégiques from the University of Lille 2, the Fonds Hospitalier d'Aide à l'Emergence from the CHRU of Lille, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut Pasteur of Lille. DES was supported by a PhD fellowship from the Conseil National de la Recherche Scientifique and the AZM & Saade Association and AC by a PhD fellowship from the University of Lille 2 and the Institut Pasteur of Lille.

### **Author's contributions**

EV, PP and LD conceived and coordinated the study and designed the protocol of investigation. CN, CM, PB, A-PB, FB, EC, GD, LL, FM, CP and MR collected samples and patient data. DES, AC, NG and GC managed and organized the collection of samples. DES, AC, NG, GC, IW, CN and FD analyzed patient data. BP performed statistical analyses. DES and AC performed molecular experiments and analyzed PCR and sequence data. EV, PP, BP, IW, FD and GC interpreted the data of the study. EV and PP drafted the manuscript. All authors provided comments and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank all those who participated in the study and staff at all participating centers: Pr P-Y Hatron, Pr E Hachulla, Pr F Gottrand, Dr F Dubos, Pr I Yakoub Agha and Dr V Coiteux (CHRU of Lille) and Christine Bureau (CHRU of Nantes).

## RESULTATS

### References

1. Tan KS: **New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**:639–665.
2. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR: **Recent developments in *Blastocystis* research.** *Adv Parasitol* 2013, **82**:1–32.
3. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Meloni D, Texier C, Delbac F, El Alaoui H : ***Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis.** *Ther Adv Infect Dis* 2013, **1**:167-178.
4. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG: **Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications.** *Acta Trop* 2013, **126**:11–18.
5. Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, Goorhuis A, van Gool T: **Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands.** *BMC Infect Dis* 2013, **13**:389.
6. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR: ***Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia.** *Infect Genet Evol* 2014, **22**:223-228.
7. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E: **Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide.** *BMC Infect Dis* 2014, **14**:164.
8. Suresh K, Smith H, Tan T: **Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:5619-5620.
9. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El AH, Delbac F, Livrelli V: **Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies.** *J Clin Microbiol* 2011, **49**:975–983.
10. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG: **Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals.** *Protist* 2013, **164**:497–509.
11. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RCA: **Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers.** *Vet Parasitol* 2010, **169**:8-17.

## RESULTATS

12. Denoeud F, Roussel M, Noël B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armamet C, Couloux A, Poulain J, Segurans B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KSW, Antigenave F, Jaillon O, Aury J, Delbac F, Wincker P, Vivarès CP, El Alaoui H: **Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite.** *Genome Biol* 2011, **12**:R29.
13. Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW: **Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases.** *Cell Microbiol* 2012, **14**:1474–1484.
14. Ajjampur SSR, Tan KSW: **Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies.** *Parasitol Int* 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>.
15. Wu Z, Mirza H, Tan KSW: **Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7.** *PLoS Negl Trop Dis* 2014, **8**:e2885.
16. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El Alaoui H: **New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002545.
17. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMango C, Wawrzyniak I, Cian A, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F, Dapoigny M, Poirier P : ***Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects.** *PLoS ONE* 2014, **9**:e111868.
18. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC: **Functional bowel disorders.** *Gastroenterology* 2006, **130**:1480-1491.
19. Pinel C, Réjasse C, Picot S, Brenier-Pinchart MP, Grillot R, Ambroise-Thomas P : ***Blastocystis hominis*: réflexions épidémiologiques et cliniques à propos de plus de 3500 examens coprologiques.** *Ann Biol Clin (Paris)* 1999, **57**:601-604.
20. Bourée P : ***Blastocystis*: commensal ou pathogène? Etude de 590 cas et revue de la littérature.** *Antibiotiques* 2007, **9**:20-24.
21. Souppart L, Sanciu G, Cian A, Wawrzyniak I, Delbac F, Capron M, Dei-Cas E, Boorom K, Delhaes L, Viscogliosi E: **Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France.** *Parasitol Res* 2009, **105**:413–421.

## RESULTATS

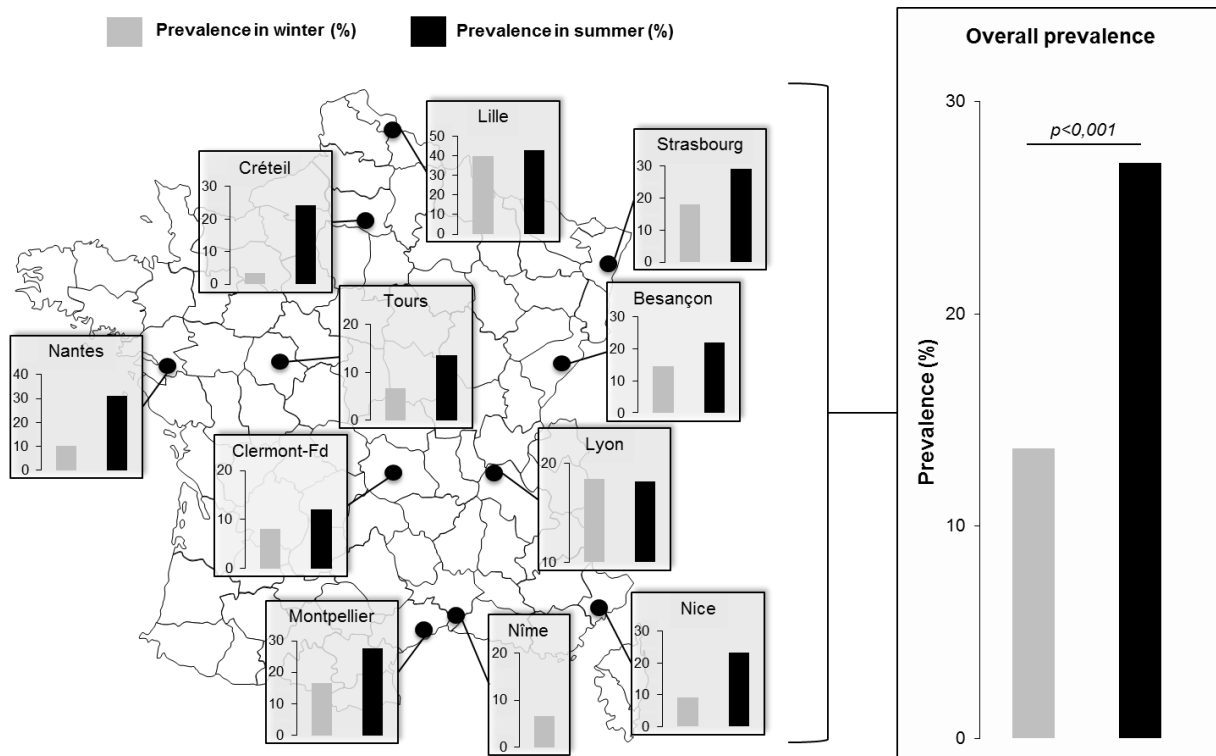
22. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV: **Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, **59**:303-307.
23. Masucci L, Graffeo R, Bani S, Bugli F, Boccia S, Nicolotti N, Fiori B, Fadda G, Spanu T: **Intestinal parasites isolated in a large teaching hospital, Italy, 1 May 2006 to 31 December 2008.** *Euro Surveill* 2011, **16**:24.
24. Gonzalez-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M: **Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain.** *Parasitol Res* 2011, **108**:87-93.
25. Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM: **Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis.** *Br J Biomed Sci* 2002, **59**:154-157.
26. Suresh K, Smith H: **Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004, **23**:509-511.
27. Haider SS, Baqai R, Qureshi FM, Boorom K: ***Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Entamoeba histolytica* exhibit similar symptomatic and epidemiological patterns in healthcare-seeking patients in Karachi.** *Parasitol Res* 2012, **111**:1357-1368.
28. Amin OM: **The epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States.** *Res J Parasitol* 2006, **1**:1-10.
29. Ithoi I, Jali A, Mak JW, Sulaiman WYW, Mahmud R: **Occurrence of *Blastocystis* in water of two rivers from recreational areas in Malaysia.** *J Parasitol Res* 2011, **2011**:123916.
30. Nimri LF: **Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan.** *J Clin Microbiol* 1993, **31**:2706-2708.
31. Dagci H, Kurt Ö, Demirel M, Östan I, Azizi NR, Mandiracioglu A, Yurdagül C, Tanyüksel M, Eroglu C, Ak M: **The prevalence of intestinal parasites in the province of Izmir, Turkey.** *Parasitol Res* 2008, **103**:839-845.
32. Pipatsatitpong D, Rangsri R, Leelayoova S, Naaglor T, Mungthin M: **Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in an orphanage in Bangkok, Thailand.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:37.

## RESULTATS

33. Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G: **Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts.** *Eur J Epidemiol* 1999, **15**:389-393.
34. Hailemariam G, Kassu A, Abebe G, Abate E, Damte D, Mekonnen E, Ota F: **Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a teaching hospital, Ethiopia.** *Jpn J Infect Dis* 2004, **57**:41-43.
35. Alemu A, Shiferaw Y, Getnet G, Yalew A, Addis Z: **Opportunistic and other intestinal parasites among HIV/AIDS patients attending Gambi higher clinic in Bahir Dar city, North West Ethiopia.** *Asian Pac J Trop Dis* 2011, **4**:661-665.
36. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, Smith HV: **Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009, **103**:892-898.
37. Stensvold CR, Nielsen SD, Badsberg J-H, Engberg J, Friis-Møller N, Nielsen SS, Nielsen HV, Friis-Møller A: **The prevalence and clinical significance of intestinal parasites in HIV-infected patients in Denmark.** *Scand J Infect Dis* 2011, **43**:129-135.
38. Adamu H, Wegayehu T, Petros B: **High prevalence of diarrhoeagenic intestinal parasite infections among non-ART HIV patients in Fitcha Hospital, Ethiopia.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e72634.
39. Tasova Y, Sahin B, Koltas S, Paydas S: **Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy.** *Acta Med Okayama* 2000, **54**:133-136.
40. Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar FG, Yolcular BO: **Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study.** *BMC Gastroenterol* 2012, **12**:122.
41. Petersen AM, Stensvold CR, Mirsepasi H, Engberg J, Friis-Møller A, Porsbo LJ, Hammerum AM, Nordgaard-Lassen I, Nielsen HV, Krogfelt KA: **Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection.** *Scand J Gastroenterol* 2013, **48**:638-639.
42. Mattiucci S, Crisafi B, Gabrielli S, Paoletti M, Cancrini G: **Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy.** *Epidemiol Infect* 2016, **144**:635-646.

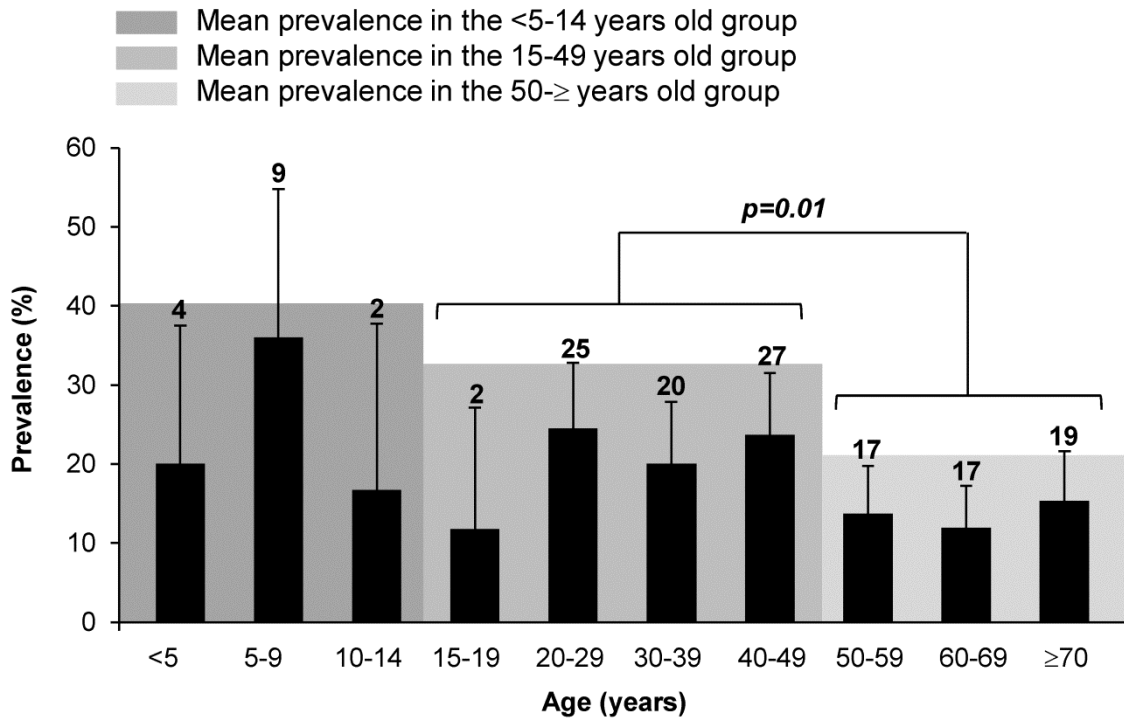
# RESULTATS

**Fig. 1** Location of the 11 French centers and seasonal prevalence of *Blastocystis* sp. by center. Prevalence data were obtained from the 788 enrolled patients. The map of France was obtained from the website Servier Medical Art (<http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>).

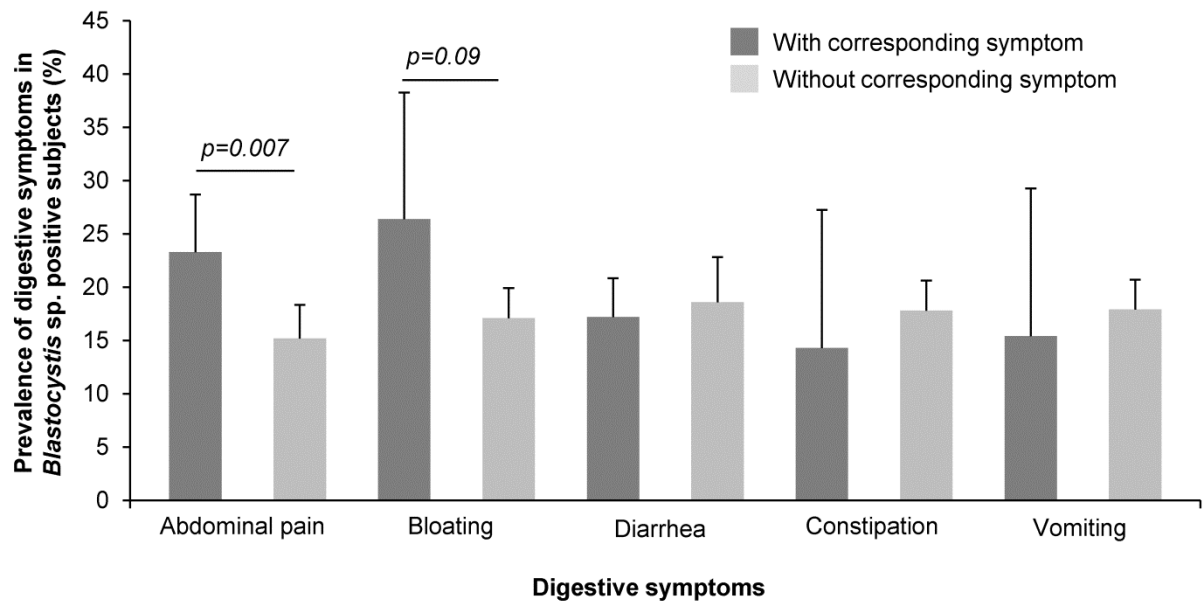


# RESULTATS

**Fig. 2** Age distribution of patients with blastocystosis (n=142)



**Fig. 3** Distribution of digestive symptoms in symptomatic patients infected or not infected with *Blastocystis* sp. (n=502)



# RESULTATS

**Table 1.** Prevalence and ST distribution of *Blastocystis* sp. by center and among the total cohort

<u>Center<sup>a</sup></u>	<u>Samples</u> (n)	<u>Positive</u> <u>samples</u> (n)	<u>Prevalence</u> (%)	<u>Blastocystis</u> sp. STs						<u>Mixed</u> <u>infection</u> (n)
				ST1	ST2	ST3	ST4	ST6	ST7	
Besançon(W)	48	7	14.6	-	2	3	2	-	-	-
Besançon(S)	41	9	22.0	1	1	2	4	-	-	1
<b>Besançon (T)</b>	<b>89</b>	<b>16</b>	<b>18.0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	-	-	<b>1</b>
Clermont-Ferrand(W)	50	4	8.0	1	-	1	1	1	-	-
Clermont-Ferrand(S)	50	6	12.0	-	-	2	4	-	-	-
<b>Clermont-Ferrand (T)</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>10.0</b>	<b>1</b>	-	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	-	-
Créteil(W)	29	1	3.4	1	-	-	-	-	-	-
Créteil(S)	29	7	24.1	1	-	6	-	-	-	-
<b>Créteil (T)</b>	<b>58</b>	<b>8</b>	<b>13.8</b>	<b>2</b>	-	<b>6</b>	-	-	-	-
Lille (W)	30	12	40.0	4	1	3	3	1	-	-
Lille (S)	21	9	42.9	2	1	3	3	-	-	-
<b>Lille (T)</b>	<b>51</b>	<b>21</b>	<b>41.2</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	-	-
Lyon(W)	38	7	18.4	3	1	2	-	-	1	-
Lyon(S)	44	8	18.2	1	2	4	-	1	-	-
<b>Lyon (T)</b>	<b>82</b>	<b>15</b>	<b>18.3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	-
Montpellier (W)	30	5	16.7	-	2	3	-	-	-	-
Montpellier (S)	29	8	27.6	1	2	3	2	-	-	-
<b>Montpellier (T)</b>	<b>59</b>	<b>13</b>	<b>22.0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	-	-	-
Nantes (W)	49	5	10.2	-	-	3	1	-	1	-
Nantes (S)	42	13	30.1	3	1	3	4	-	1	1
<b>Nantes (T)</b>	<b>91</b>	<b>18</b>	<b>19.8</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	-	<b>2</b>	<b>1</b>
Nice (W)	33	3	9.1	-	1	2	-	-	-	-
Nice (S)	30	7	23.3	-	1	6	-	-	-	-
<b>Nice (T)</b>	<b>63</b>	<b>10</b>	<b>15.9</b>	-	<b>2</b>	<b>8</b>	-	-	-	-
Nîmes (W)	30	2	6.7	-	-	2	-	-	-	-
Nîmes (S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Nîmes (T)</b>	<b>30</b>	<b>2</b>	<b>6.7</b>	-	-	<b>2</b>	-	-	-	-
Strasbourg (W)	50	9	18.0	3	-	4	2	-	-	-
Strasbourg (S)	48	14	29.2	3	3	7	1	-	-	-
<b>Strasbourg (T)</b>	<b>98</b>	<b>23</b>	<b>23.5</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	-	-	-
Tours(W)	30	2	6.7	2	-	-	-	-	-	-
Tours(S)	37	5	13.5	2	-	2	1	-	-	-
<b>Tours (T)</b>	<b>67</b>	<b>7</b>	<b>10.4</b>	<b>4</b>	-	<b>2</b>	<b>1</b>	-	-	-
<b>Total (W)</b>	<b>417</b>	<b>57</b>	<b>13.7</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>23</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>Total (S)</b>	<b>371</b>	<b>86</b>	<b>23.2</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>38</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Grand total</b>	<b>788</b>	<b>143</b>	<b>18.1</b>	<b>28</b>	<b>18</b>	<b>61</b>	<b>28</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

<sup>a</sup>W, winter ; S, summer ; T, total



## RESULTATS

**Table 2** Total and seasonal distribution of *Blastocystis* sp. STs (n=141)

<i>Blastocystis</i> sp. STs	ST1	ST2	ST3	ST4	ST6	ST7
Winter n (%)	14 (24.1)	7 (12.1)	23 (39.7)	9 (15.5)	2 (3.4)	2 (3.4)
Summer n (%)	14 (16.7)	11 (13.1)	38 (45.2)	19 (22.6)	1 (1.2)	1 (1.2)
<b>Total n (%)</b>	<b>28 (20.0)</b>	<b>18 (12.8)</b>	<b>61 (43.3)</b>	<b>28 (20.0)</b>	<b>3 (2.1)</b>	<b>3 (2.1)</b>

**Table 3.** Prevalence of *Blastocystis* sp. in European countries

Country	Region/city	Total number of patients	Method of detection	Prevalence	Reference
France	Grenoble	2,581	Direct-light microscopy	3.0%	[19]
France	Paris	9,700	Direct-light microscopy	6.1%	[20]
France	Clermont-Ferrand	186	qPCR	14.5%	[9]
France	Multi-center study	788	qPCR	18.1%	Present study
The Netherlands	Amsterdam	442	PCR	24.2%	[5]
Denmark	Copenhagen	93	PCR	23.0%	[22]
Italy	Rome	5,351	Direct-light microscopy	7,1%	[23]
Spain	Catalonia	8,313	Direct-light microscopy	7.0%	[24]
United Kingdom (Wales)	Aberystwyth	1,390	Direct-light microscopy	6.9%	[25]
United Kingdom (Scotland)	Glasgow	1,000	<i>In vitro</i> culture and direct-light microscopy	3.9%	[26]

# RESULTATS

## Additional files

**Additional file 1.** Isolation source (center), season of collect, ST identification and GenBank accession number of *Blastocystis* sp. isolates characterized in our study.

Isolate	Center	Season <sup>a</sup>	<i>Blastocystis</i> sp. ST	GenBank accession number
HT1	Tours	W	ST1	KU158944
HT5	Tours	W	ST1	KU158945
ET4	Tours	S	ST3	KU158946
ET12	Tours	S	ST1	KU158947
ET27	Tours	S	ST3	KU158948
ET35	Tours	S	ST4	KU158949
ET40	Tours	S	ST1	KU158950
HBS14	Besançon	W	ST4	KU158951
HBS22	Besançon	W	ST2	KU158952
HBS26	Besançon	W	ST2	KU158953
HBS27	Besançon	W	ST3	KU158954
HBS30	Besançon	W	ST4	KU158955
HBS41	Besançon	W	ST3	KU158956
HBS43	Besançon	W	ST3	KU158957
EBS5	Besançon	S	ST3	KU158958
EBS7	Besançon	S	ST2	KU158959
EBS15	Besançon	S	ST4	KU158960
EBS19	Besançon	S	ST3	KU158961
EBS27	Besançon	S	ST4	KU158962
EBS30	Besançon	S	ST4	KU158963
EBS33	Besançon	S	ST4	KU158964
EBS42	Besançon	S	ST1	KU158965
HLi1	Lille	W	ST3	KU158966
HLi2	Lille	W	ST1	KU158967
HLi8	Lille	W	ST4	KU158968
HLi9	Lille	W	ST1	KU158969
HLi13	Lille	W	ST6	KU158970
HLi14	Lille	W	ST4	KU158971
HLi15	Lille	W	ST2	KU158972
HLi18	Lille	W	ST3	KU158973
HLi20	Lille	W	ST3	KU158974
HLi25	Lille	W	ST1	KU158975
HLi29	Lille	W	ST1	KU158976
HLi30	Lille	W	ST4	KU158977
ELi1	Lille	S	ST3	KU158978
ELi2	Lille	S	ST1	KU158979
ELi3	Lille	S	ST4	KU158980
ELi4	Lille	S	ST2	KU158981
ELi8	Lille	S	ST1	KU158982
ELi10	Lille	S	ST3	KU158983
ELi12	Lille	S	ST4	KU158984
ELi17	Lille	S	ST3	KU158985

## RESULTATS

ELi18	Lille	S	ST4	KU158986
HMon11	Montpellier	W	ST2	KU158987
HMon13	Montpellier	W	ST3	KU158988
HMon15	Montpellier	W	ST3	KU158989
HMon28	Montpellier	W	ST2	KU158990
HMon29	Montpellier	W	ST3	KU158991
EMon3	Montpellier	S	ST1	KU158992
EMon4	Montpellier	S	ST3	KU158993
EMon5	Montpellier	S	ST3	KU158994
EMon8	Montpellier	S	ST4	KU158995
EMon17	Montpellier	S	ST4	KU158996
EMon18	Montpellier	S	ST3	KU158997
EMon25	Montpellier	S	ST2	KU158998
EMon26	Montpellier	S	ST2	KU158999
HNI7	Nîmes	W	ST3	KU159000
HNI25	Nîmes	W	ST3	KU159001
HNC13	Nice	W	ST3	KU159002
HNC21	Nice	W	ST3	KU159003
HNC36	Nice	W	ST2	KU159004
ENC5	Nice	S	ST3	KU159005
ENC8	Nice	S	ST3	KU159006
ENC9	Nice	S	ST3	KU159007
ENC11	Nice	S	ST3	KU159008
ENC12	Nice	S	ST3	KU159009
ENC13	Nice	S	ST2	KU159010
ENC22	Nice	S	ST3	KU159011
HSTB3	Strasbourg	W	ST1	KU159012
HSTB4	Strasbourg	W	ST1	KU159013
HSTB6	Strasbourg	W	ST3	KU159014
HSTB12	Strasbourg	W	ST4	KU159015
HSTB14	Strasbourg	W	ST4	KU159016
HSTB18	Strasbourg	W	ST1	KU159017
HSTB22	Strasbourg	W	ST3	KU159018
HSTB28	Strasbourg	W	ST3	KU159019
HSTB31	Strasbourg	W	ST3	KU159020
ESTB17	Strasbourg	S	ST3	KU159021
ESTB19	Strasbourg	S	ST2	KU159022
ESTB20	Strasbourg	S	ST2	KU159023
ESTB22	Strasbourg	S	ST3	KU159024
ESTB29	Strasbourg	S	ST2	KU159025
ESTB32	Strasbourg	S	ST1	KU159026
ESTB34	Strasbourg	S	ST4	KU159027
ESTB35	Strasbourg	S	ST3	KU159028
ESTB38	Strasbourg	S	ST1	KU159029
ESTB39	Strasbourg	S	ST3	KU159030
ESTB40	Strasbourg	S	ST3	KU159031
ESTB44	Strasbourg	S	ST3	KU159032
ESTB49	Strasbourg	S	ST1	KU159033

## RESULTATS

ESTB50	Strasbourg	S	ST3	KU159034
HLY2	Lyon	W	ST1	KU159035
HLY5	Lyon	W	ST2	KU159036
HLY27	Lyon	W	ST1	KU159037
HLY29	Lyon	W	ST7	KU159038
HLY32	Lyon	W	ST1	KU159039
HLY35	Lyon	W	ST3	KU159040
HLY36	Lyon	W	ST3	KU159041
ELY17	Lyon	S	ST2	KU159042
ELY23	Lyon	S	ST3	KU159043
ELY28	Lyon	S	ST1	KU159044
ELY34	Lyon	S	ST2	KU159045
ELY35	Lyon	S	ST3	KU159046
ELY36	Lyon	S	ST3	KU159047
ELY45	Lyon	S	ST3	KU159048
ELY46	Lyon	S	ST6	KU159049
HNA4	Nantes	W	ST7	KU159050
HNA12	Nantes	W	ST3	KU159051
HNA32	Nantes	W	ST3	KU159052
HNA36	Nantes	W	ST3	KU159053
HNA38	Nantes	W	ST4	KU159054
ENA5	Nantes	S	ST3	KU159055
ENA10	Nantes	S	ST1	KU159056
ENA17	Nantes	S	ST3	KU159057
ENA20	Nantes	S	ST4	KU159058
ENA25	Nantes	S	ST1	KU159059
ENA27	Nantes	S	ST1	KU159060
ENA33	Nantes	S	ST7	KU159061
ENA34	Nantes	S	ST3	KU159062
ENA36	Nantes	S	ST4	KU159063
ENA37	Nantes	S	ST4	KU159064
ENA39	Nantes	S	ST2	KU159065
ENA41	Nantes	S	ST4	KU159066
HCF11	Clermont-Ferrand	W	ST6	KU159067
HCF19	Clermont-Ferrand	W	ST1	KU159068
HCF30	Clermont-Ferrand	W	ST4	KU159069
HCF50	Clermont-Ferrand	W	ST3	KU159070
ECF52	Clermont-Ferrand	S	ST4	KU159071
ECF54	Clermont-Ferrand	S	ST3	KU159072
ECF64	Clermont-Ferrand	S	ST4	KU159073
ECF71	Clermont-Ferrand	S	ST4	KU159074
ECF72	Clermont-Ferrand	S	ST4	KU159075
ECF85	Clermont-Ferrand	S	ST3	KU159076
HCR1	Créteil	W	ST1	KU159077
ECR32	Créteil	S	ST3	KU159078
ECR34	Créteil	S	ST3	KU159079
ECR35	Créteil	S	ST3	KU159080
ECR38	Créteil	S	ST3	KU159081

## RESULTATS

ECR42	Créteil	S	ST3	KU159082
ECR45	Créteil	S	ST3	KU159083
ECR50	Créteil	S	ST1	KU159084

<sup>a</sup>W, winter ; S, summer

**Additional file 2.** Post hoc comparison of the prevalence of *Blastocystis* sp. between age groups.

<i>p-values</i>	<15 years (26.3%)	15-49 years (22.2%)	≥ 50 years (13.6%)
<15 years (26.3%)	NA <sup>a</sup>	0.78	0.11
15-49 years (22.2%)	0.78	NA	0.01
≥ 50 years (13.6%)	0.11	0.01	NA

<sup>a</sup> NA, Not achieved

## RESULTATS

**Additional file 3.** Presence of other enteric parasites (protozoans and helminths) and digestive symptoms in the 143 French patients infected with *Blastocystis* sp.

Patients	<i>Blastocystis</i> sp. ST	Other parasites identified by direct-light microscopy	Digestive symptoms <sup>a</sup>
HT1	ST1	<i>Entamoeba coli, Endolimax nana</i>	-
HT5	ST1	-	-
HBS14	ST4	-	+
HBS22	ST2	-	+
HBS26	ST2	-	-
HBS27	ST3	-	-
HBS30	ST4	<i>Enterobius vermicularis</i>	+
HBS41	ST3	-	-
HBS43	ST3	<i>E. coli, E. nana</i>	+
HNA4	ST7	-	-
HNA12	ST3	<i>E. coli</i>	-
HNA32	ST3	<i>E. coli, Schistosoma mansoni</i>	-
HNA36	ST3	-	+
HNA38	ST4	-	+
HLi1	ST3	<i>E. histolytica, E. dispar</i>	+
HLi2	ST1	<i>G. intestinalis, E. histolytica / dispar, Trichuris trichiura</i>	+
HLi8	ST4	-	+
HLi9	ST1	-	-
HLi13	ST6	-	+
HLi14	ST4	<i>Strongyloïdes stercoralis, Ancylostoma sp.</i>	+
HLi15	ST2	<i>E. coli, E. histolytica, E. nana</i>	-
HLi18	ST3	-	-
HLi20	ST3	-	+
HLi25	ST1	-	+
HLi29	ST1	-	+
HLi30	ST4	-	+
HLY2	ST1	-	-
HLY5	ST2	-	+
HLY27	ST1	<i>E. histolytica, E. nana</i>	-
HLY29	ST7	-	+
HLY32	ST1	-	+
HLY35	ST3	-	+
HLY36	ST3	-	-
HMon11	ST2	-	+
HMon13	ST3	-	+
HMon15	ST3	-	-
HMon28	ST2	-	+
HMon29	ST3	<i>Hymenolepis nana, E. nana, E. coli</i>	+

## RESULTATS

HNC13	ST3	-	+
HNC21	ST3	<i>Schistosoma haematobium</i>	-
HNC36	ST2	<i>G. intestinalis</i>	+
HSTB3	ST1	-	-
HSTB4	ST1	<i>Dientamoeba fragilis</i>	+
HSTB6	ST3	-	-
HSTB12	ST4	-	+
HSTB14	ST4	-	+
HSTB18	ST1	<i>Cryptosporidium</i> sp., <i>E. dispar</i>	+
HSTB22	ST3	<i>D. fragilis</i>	+
HSTB28	ST3	-	-
HSTB31	ST3	-	-
HCF11	ST6	-	-
HCF19	ST1	-	+
HCF30	ST4	-	+
HCF50	ST3	-	+
HNIM7	ST3	-	+
HNIM25	ST3	-	+
HCR1	ST1	-	+
ET4	ST3	<i>G. intestinalis</i>	+
ET12	ST1	-	-
ET27	ST3	-	-
ET35	ST4	-	+
ET40	ST1	<i>Cryptosporidium</i> sp.	+
EBS5	ST3	-	+
EBS7	ST2	-	-
EBS15	ST4	-	-
EBS19	ST3	-	+
EBS26	Mixed infection	-	+
EBS27	ST4	-	+
EBS30	ST4	-	+
EBS33	ST4	-	-
EBS42	ST1	-	-
ENA5	ST3	-	+
ENA10	ST1	<i>E. nana</i> , <i>E. coli</i>	+
ENA17	ST3	<i>E. coli</i>	+
ENA20	ST4	-	+
ENA25	ST1	<i>E. coli</i> , <i>E. dispar</i> or <i>E. histolytica</i> , <i>E. hartmanii</i> , <i>Pentatrichomonas hominis</i>	-
ENA27	ST1	-	-
ENA33	ST7	-	NA
ENA34	ST3	-	+
ENA36	ST4	-	-
ENA37	ST4	-	+
ENA39	ST2	-	+

## RESULTATS

ENA41	ST4	-	+
ENA42	Mixed infection	-	NA
ELi1	ST3	-	+
ELi2	ST1	-	NA
ELi3	ST4	-	NA
ELi4	ST2	-	+
ELi8	ST1	-	+
ELi10	ST3	<i>E. nana, Pseudolimax butschlii</i>	+
ELi12	ST4	-	+
ELi17	ST3	-	NA
ELi18	ST4	-	+
ELY17	ST2	-	NA
ELY23	ST3	-	+
ELY28	ST1	-	+
ELY34	ST2	-	+
ELY35	ST3	-	+
ELY36	ST3	-	+
ELY45	ST3	-	+
ELY46	ST6	-	+
EMon3	ST1	<i>E. nana, E. coli</i>	+
EMon4	ST3	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	+
EMon5	ST3	-	+
EMon8	ST4	-	NA
EMon17	ST4	-	+
EMon18	ST3	-	+
EMon25	ST2	-	NA
EMon26	ST2	-	NA
ENC5	ST3	-	+
ENC8	ST3	-	+
ENC9	ST3	-	+
ENC11	ST3	<i>Schistosoma sp.</i>	+
ENC12	ST3	-	+
ENC13	ST2	-	+
ENC22	ST3	-	+
ESTB17	ST3	-	-
ESTB19	ST2	-	-
ESTB20	ST2	-	NA
ESTB22	ST3	-	NA
ESTB29	ST2	-	+
ESTB32	ST1	-	+
ESTB34	ST4	-	NA
ESTB35	ST3	-	+
ESTB38	ST1	-	+
ESTB39	ST3	<i>Sarcocystis hominis</i>	+
ESTB40	ST3	-	+



## RESULTATS

ESTB44	ST3	-	NA
ESTB49	ST1	-	+
ESTB50	ST3	-	+
ECF2	ST4	-	+
ECF4	ST3	<i>G. intestinalis</i>	+
ECF14	ST4	-	-
ECF21	ST4	-	+
ECF22	ST4	-	+
ECF35	ST3	-	-
ECR32	ST3	-	+
ECR34	ST3	-	-
ECR35	ST3	-	-
ECR38	ST3	-	-
ECR42	ST3	-	-
ECR45	ST3	<i>Cryptosporidium sp.</i>	+
ECR50	ST1	-	+

<sup>a</sup> NA, not available

## 2. Evaluation du potentiel zoonotique de *Blastocystis* sp.

### Enquête épidémiologique chez les animaux de zoos en France.

Préambule : Cette étude fait l'objet d'une publication soumise dans le journal «PLoS ONE».

#### a. Introduction

*Blastocystis* sp. est un parasite infectant l'Homme mais aussi de nombreux groupes d'animaux comme les primates, les bovins, les cochons, les rongeurs, les oiseaux, les marsupiaux, les amphibiens, les reptiles ou les insectes pour ne citer que les principaux. Comme décrit précédemment, 17 STs de *Blastocystis* sp. ont été identifiés chez les mammifères et les oiseaux et 9 d'entre eux ont été trouvés chez l'Homme (ST1 à ST9) avec des fréquences variables. A l'exception du ST9, les 8 autres STs présentent une spécificité d'hôte variable et peuvent aussi être trouvés chez différents groupes d'animaux. Dans plusieurs études récentes, les mêmes STs ont été trouvés dans la population humaine et chez des animaux vivant à proximité et de ce fait, il a donc été proposé qu'une partie des infections humaines était le résultat d'une transmission zoonotique (Parkar et al., 2007 ; Yoshikawa et al., 2009 ; Lee et al., 2012a ; Nagel et al., 2012 ; Wang et al., 2014). De plus, une plus forte prévalence du parasite a été observée pour des cohortes d'individus étant en contact direct avec des animaux comme le personnel des zoos ou d'élevages (Parkar et al., 2010 ; Wang et al., 2014). Même si toutes ces évidences témoignaient du pouvoir zoonotique de ce parasite, la contribution de chaque groupe d'animaux dans ce mode de transmission restait encore à clarifier. Pour cela, quelques enquêtes épidémiologiques avaient déjà été menées, pour des raisons de facilité, principalement dans des zoos dans différents pays mais elles ne prenaient en compte qu'un nombre assez restreint de groupes d'animaux (Stensvold et al., 2009a ; Parkar et al., 2007, 2010 ; Alfellani et al., 2013a ; Roberts et al., 2013). Aussi, nous avons mené ce qui est à notre connaissance la plus large étude épidémiologique de *Blastocystis* sp. jamais réalisée chez les animaux. Nous avons ainsi pu analyser plus de 300 échantillons recueillis pour plus de 160 espèces animales hébergées dans les zoos de Lille et de La Palmyre.

#### b. Résultats

Cian A.\*, El Safadi D.\*, Osman M.\*, Moriniere R., Gantois N., Benamrouz-Vanneste S., Delgado-Viscogliosi P., Guyot K., Li L.L., Monchy S., Noël C., Poirier P., Nourrisson C., Wawrzyniak I., Delbac F., Bosc S., Chabé M., Petit T., Certad G., Viscogliosi E. 2016.

# RESULTATS

Molecular epidemiology of *Blastocystis* spp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE* soumis

**\*co-premiers auteurs**

## **c. Conclusion**

L'un des résultats majeurs de cette étude était la forte prévalence du parasite observée dans ces deux zoos français puisque globalement, 32,2% des échantillons et 37,9% des espèces testées s'avéraient infectés par *Blastocystis* sp. De plus, de fortes variations de prévalence ont été observées entre groupes d'animaux puisque les primates et les artiodactyles se sont montrés fortement parasités ce qui n'était pas le cas des carnivores et des oiseaux. En outre, même si ces données ont été obtenues chez des animaux en captivité, les prévalences et distributions des STs de *Blastocystis* sp. étaient, pour plusieurs groupes d'animaux, assez similaires à celles observées pour ces mêmes groupes dans des conditions d'élevage ou à l'état sauvage. En combinant toutes nos données à celles déjà disponibles dans la littérature, il apparaît que les primates, les artiodactyles, et en particulier le bétail, et les oiseaux représentent les principaux réservoirs potentiels de transmission zoonotique. Par contre, cela ne semble pas être le cas des carnivores qui englobent la majorité des animaux de compagnie. En plus de parfaire notre connaissance de l'épidémiologie de *Blastocystis* sp. chez les animaux, notre étude a fourni des informations permettant de prendre des mesures de prévention et de contrôle pour limiter non seulement l'impact de cette infection chez les animaux de zoos mais aussi les risques de transmission zoonotique aux gardiens et soigneurs de ces parcs zoologiques.

### **Ma contribution dans cette étude :**

- ✓ Participation à la mise en place de l'étude
- ✓ Récolte des échantillons dans les zoos
- ✓ Gestion des collections d'échantillons
- ✓ Enregistrement des données
- ✓ Génotypage des isolats de *Blastocystis* sp. et analyse des données de séquençage
- ✓ Participation à la rédaction de l'article

# RESULTATS

Submission Confirmation for PONE-D-16-41355 - [EMID:504d...

**Sujet :** Submission Confirmation for PONE-D-16-41355 - [EMID:504dd4230b74fb72]

**De :** "PLOS ONE" <em@editorialmanager.com>

**Date :** 17/10/2016 15:10

**Pour :** "Eric Viscogliosi" <eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr>

PONE-D-16-41355

Molecular epidemiology of Blastocystis spp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk  
PLOS ONE

Dear Dr. Viscogliosi,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'Molecular epidemiology of Blastocystis spp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk' to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-16-41355.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>. If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript please contact [plosone@plos.org](mailto:plosone@plos.org).

We'd like to know more about your experience with us. Do you have an ORCID id?

Yes, I have an ORCID id: <http://surveys.plos.org/s3/ORCID?answer=yes>

No, I don't have an ORCID id: <http://surveys.plos.org/s3/ORCID?answer=no>

What's ORCID?: <http://surveys.plos.org/s3/ORCID?answer=dontknow>

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,  
PLOS ONE

**PLOS ONE** A Peer-Reviewed, Open Access Journal

Editorial Manager®

Role: Author Username: eviscogliosi

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Submissions Being Processed for Author Eric Viscogliosi

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	PONE-D-16-41355	Molecular epidemiology of Blastocystis spp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk	Oct 17 2016 9:10AM	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

## RESULTATS

### **Article 6: Molecular epidemiology of *Blastocystis* spp. in various animal groups from two French zoos and evaluation of potential zoonotic risk**

Short title: Molecular epidemiology of *Blastocystis* spp. in zoo animals

Amandine Cian<sup>1¶</sup>, Dima El Safadi<sup>1,2¶</sup>, Marwan Osman<sup>1,2¶</sup>, Romain Moriniere<sup>3</sup>, Nausicaa Gantois<sup>1</sup>, Sadia Benamrouz-Vanneste<sup>1,4</sup>, Pilar Delgado-Viscogliosi<sup>1</sup>, Karine Guyot<sup>1</sup>, Luen-Luen Li<sup>5</sup>, Sébastien Monchy<sup>5</sup>, Christophe Noël<sup>6</sup>, Philippe Poirier<sup>7</sup>, Céline Nourrisson<sup>7</sup>, Ivan Wawrzyniak<sup>7</sup>, Frederic Delbac<sup>7</sup>, Stéphanie Bosc<sup>3</sup>, Magali Chabé<sup>1</sup>, Thierry Petit<sup>8</sup>, Gabriela Certad<sup>1,9</sup>, Eric Viscogliosi<sup>1\*</sup>

1 Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, Lille, France

2 Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon

3 Parc Zoologique de Lille, Lille, France

4 Laboratoire Ecologie et Biodiversité, Faculté Libre des Sciences et Technologies de Lille, Université Catholique de Lille, Lille, France

5 Laboratoire d’Océanologie et de Géosciences, CNRS UMR 8187, Université du Littoral Côte d’Opale, Wimereux, France

6 Geneius Laboratories Ltd., INEX Business Centre, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom

7 Clermont Université, Université Blaise Pascal-Université d’Auvergne - CNRS UMR 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France

8 Parc Zoologique de La Palmyre, Les Mathes, France

9 Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille, Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, France

\* Corresponding author

E-mail: eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

¶These authors contributed equally to this work.

## RESULTATS



### **Abstract**

*Blastocystis* spp. is a common intestinal parasite infecting humans and a wide range of animals worldwide. It exhibits an extensive genetic diversity and 17 subtypes (STs) have thus far been identified in mammalian and avian hosts. Since several STs are common to humans and animals, it was proposed that a proportion of human infections may result from zoonotic transmission. However, the contribution of each animal source to human infection remains to be clarified. Therefore, the aim of this study was to expand our knowledge of the epidemiology and host specificity of this parasite by performing the largest epidemiological survey ever conducted in animal groups. A total of 307 stool samples from 161 mammalian and non-mammalian species in two French zoos were screened by real-time PCR for the presence of *Blastocystis* spp. Overall, 32.2% of the animal samples and 37.9% of the species tested were shown to be infected with the parasite. A total of 111 animal isolates were subtyped, and 11 of the 17 mammalian and avian STs as well as additional STs previously identified in reptiles and insects were found with a varying prevalence according to animal groups. These data were combined with those obtained from previous surveys to evaluate the potential risk of zoonotic transmission of *Blastocystis* spp. through the comparison of ST distribution between human and animal hosts. This suggests that non-human primates, artiodactyls and birds may serve as reservoirs for human infection, especially in animal handlers. In contrast, other mammals such as carnivores, and non-mammalian groups including reptiles and insects, do not seem to represent significant sources of *Blastocystis* spp. infection in humans. In further studies, more intensive sampling and screening of potential new animal hosts will reinforce these statements and expand our understanding of the circulation of *Blastocystis* spp. in animal and human populations.

# RESULTATS

## Introduction

*Blastocystis* spp. is an enteric protozoan with a worldwide distribution belonging to the group Stramenopiles and currently identified as one of the most common single-celled eukaryotes found in human stool samples [1-3]. Indeed, its prevalence can reach 20% in industrialized countries [4,5] and can largely exceed 50% in developing countries [6]. A recent study even showed a prevalence of 100% in a cohort of children living in a rural area of Senegal [7]. Such a high prevalence of *Blastocystis* spp. clearly raises the question of the impact of this parasite in human health. Since asymptomatic carriage by *Blastocystis* spp. is very common, its role in human health and disease remains uncertain [8,9]. However, recent genomic data [10] coupled with *in-vitro* and *in-vivo* studies [11,12] allowed the identification of putative virulence factors and demonstrated the damaging effects of the parasite on the intestinal barrier, leading to plausible models of pathogenesis [8,13]. In addition, *Blastocystis* spp. colonization was shown to be associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota [14], suggesting that the parasite requires high overall microbial diversity to become established in the human colon [3]. Hence, much current data suggests that this parasite should be associated with non-specific gastrointestinal symptoms including diarrhea, abdominal pain, and vomiting [1], and is suspected to be linked to irritable bowel syndrome [13] and urticaria [15].

*Blastocystis* spp. has also been reported in the intestinal tract of a wide range of animal hosts, including non-human primates (NHPs) and other mammals such as artiodactyls, perissodactyls, proboscideans, rodents, and marsupials, as well as birds, reptiles, amphibians, fish, annelids, and insects [16-18]. Among the genus *Blastocystis*, a large genetic diversity has been identified based on the comparison of small subunit (SSU) rDNA gene sequences. Consequently, isolates from mammalian and avian hosts were classified in 17 divergent lineages termed subtypes (STs) and arguably separate species [19]. Potential additional STs were also proposed in non-mammalian and avian hosts (so-called NMASTs in the present study for non-mammalian and avian STs) including amphibians, reptiles, and insects [20]. Among the 17 mammalian and avian STs, nine of them (ST1 to ST9) have been reported in humans with varying prevalence [2,21]. Approximately 90% of human isolates subtyped so far belong to ST1 to ST4, with a predominance of ST3 (around 60% of these isolates). With the exception of ST9 only found until now in humans, the other 8 STs display low to moderate host specificity by also colonizing various animal groups [6,19,20,22-26]. Consequently, these animal groups could represent potential reservoirs of zoonotic transmission, as reported in recent surveys [27-29]. Additional evidence strongly supports the

## RESULTATS

zoonotic potential of *Blastocystis* spp., as a higher prevalence of this parasite is observed amongst animal handlers in comparison with individuals without contact with animals [24,25,30]. Moreover, successful experimental infections of chickens and rats with human isolates demonstrated the likely transmission of the parasite between human and animal hosts [31].

For a better understanding of the molecular epidemiology and transmission of *Blastocystis* spp., the ST distribution of the parasite was reported in several surveys conducted in a limited number of animal groups mainly from zoological gardens [19,23-25,32,33], national parks [34] and farms [30,35,36]. In France, only one study has recently been published on the identification and ST distribution of *Blastocystis* spp. in animals, which focused on a restricted cohort of household dogs [37]. Therefore, additional epidemiological data is needed to identify potential animal reservoirs of human infection. The first aim of the present study was thus to determine the prevalence of *Blastocystis* spp. among numerous animal groups in two French zoos, and to genetically characterize the positive samples in order to increase our knowledge of the epidemiology and host specificity of this parasite. The second goal was to compile our molecular data with all those available in the literature from previous epidemiological surveys in order to evaluate the potential risk of zoonotic transmission of each animal group through the comparative analysis of the ST distribution between human and animal populations.

### **Materials and Methods**

#### **Ethics statement**

The study was conducted in the presence and under the responsibility of veterinarians from the two zoos. Only fecal samples collected after the spontaneous defecation of the zoo animals were analyzed. Consequently, this study did not require full Animal Ethics Committee approval in accordance with French law.

#### **Study sites**

The Zoological Park of La Palmyre (La Palmyre Zoo) is located in the town of Les Mathes near Royan, in the department of Charente-Maritime, Southwest France, and is visited by nearly 700,000 people per year. It covers around 18 hectares and houses approximately 1,600 animals belonging to 115 different species. The Lille Zoo, located near the city center, in Northern France, hosts between 850,000 and 1 million visitors annually. It is nestled in a



## RESULTATS

green area of 3.5 hectares and houses approximately 350 animals belonging to 70 different species.

### **Sampling**

At the La Palmyre Zoo, a total of 209 fresh fecal samples were collected in April 2014 from 94 different species, while a total of 98 fecal samples were obtained in June 2015 from 67 different species at the Lille Zoo. The full sampling covered a large variety of mammalian groups together with several avian orders and representatives of reptiles and insects. In both zoos, one to seven fecal samples were collected from each species screened, depending on the number of individuals housed by species. In addition, mixed and/or individual stool samples were obtained from each species, depending on whether the animals were housed separately or not. In the late afternoon, the majority of the animals in both zoos were moved from their day to night enclosures. Fresh fecal samples were thus collected early in the morning before the cleaning of animal cages. For some avian species with no night enclosures, collection of stool samples was also performed carefully directly on the ground or in their nests. For reptiles, feces were recovered from their pens while as fresh as possible. Collection of stool samples was performed in the presence of zookeepers and was strictly controlled to minimize potential contamination between animal species. Feces were collected in sterilized plastic containers using disposable spoons, then preserved at -20°C for further genomic investigation. At the Lille Zoo, house mice (*Mus musculus*) and Norway rats (*Rattus norvegicus*), as well as insects, were bred and given as food to some other animals. Mixed stool samples from these rodents were obtained in their cages after defecation and preserved as described above. Regarding insects, individuals were isolated in their flocks and then decapitated. The hindgut was immediately removed from the abdomen with a pair of tweezers and dissected into phosphate-buffered saline (PBS). The suspended content of the hindgut was aspirated and used for immediate DNA extraction. In the case of the desert locust, the droppings were also collected and analyzed.

### **DNA extraction, amplification of the SSU rDNA gene and molecular subtyping of *Blastocystis* spp. isolates**

Genomic DNA was extracted directly from approximately 250 mg of each fecal sample or from 100 µl of the hindgut content of insects in PBS using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended procedures. DNA was eluted in 100 µl of AE buffer (Qiagen) to increase its concentration and stored at -

## RESULTATS

20°C until being analyzed. For each sample, 1 µl of extracted DNA was subjected to a real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) assay using the *Blastocystis* spp.-specific primers BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAA-3') and BL18SR2PP (5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3') designed by Poirier et al. [38]. These primers target a DNA fragment of 320 to 342 bp of the *Blastocystis* spp. SSU rDNA gene, depending on the ST. This domain of the SSU-rDNA gene has been shown to provide sufficient information for differentiating STs of *Blastocystis* spp. [5,38]. DNA extraction controls (isolation of DNAs without stool and from a *Blastocystis* spp.-negative stool) subsequently used in qPCR assays and positive (DNA obtained from *Blastocystis* sp. ST4 or ST7 cultures) and negative (DNA matrix replaced by water) qPCR controls were performed. The positive qPCR products were purified and directly sequenced on both strands in a sequencing facility (Genoscreen, Lille, France). Direct sequencing of several qPCR products generated mixed signals that could reflect infections by different STs. These samples were thus re-analyzed by non-qPCR using the same primer pair as for qPCR. Non-qPCR amplifications were performed in 50 µl according to standard conditions for Platinum *Taq* High-Fidelity DNA polymerase (Invitrogen, Groningen, the Netherlands). After denaturation at 94°C for 5 min, 40 cycles of amplification were performed with a Bioer LifeECO apparatus (Binjiang District, China) as follows: 30 s at 94°C, 35 s at 60 °C, and 50 s at 68°C. The final extension was continued for 2 min. Non-qPCR products were separated by agarose gel electrophoresis and bands of the expected size (approximately 320 bp) were purified using the Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI, USA). Purified PCR products were cloned in the T-vector, pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) and amplified in *Escherichia coli* One Shot TOP10 competent cells. Minipreparations of plasmid DNA were done using the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Five positive clones containing inserts of approximately the expected size were arbitrarily selected for each sample and sequenced on both strands. The SSU rDNA gene sequences obtained in this study were deposited in GenBank under accession numbers KR259402 to KR259512 (S1 Table). The sequences obtained were compared with all *Blastocystis* spp. homologous sequences available from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) using the nucleotide BLAST program. The STs were identified by determining the exact match or closest similarity against all known mammalian and avian *Blastocystis* spp. STs according to the last classification by Alfellani et al. [19].

## RESULTATS

### **Phylogenetic analysis of *Blastocystis* spp. isolates**

Nine of the SSU rDNA gene sequences obtained in the present study for eight *Blastocystis* spp. isolates exhibited low similarity ( $\leq 92\%$ ) with homologous sequences available in the databases. To clarify their identification via phylogenetic tools, these sequences were thus added to a large dataset including (i) 33 sequences of *Blastocystis* spp. isolates representing ST1 to ST10 and ST13 to ST17 (ST11 and ST12 SSU rDNA gene sequences are not yet available for this particular domain) [25] and (ii) 22 homologous sequences representing 7 potential NMASTs according to the recent phylogenetic analysis by Yoshikawa et al. [20]. The SSU rDNA genes sequences were aligned using the BioEdit v7.2.5 package ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)). All positions containing gaps were eliminated and the phylogenetic inference was restricted to 246 sites that could be unambiguously aligned. Phylogenetic analyses were performed using Neighbor-Joining and maximum likelihood methods implemented in MEGA6. The maximum likelihood analysis was based on the Tamura-Nei model [39], and initial trees for the heuristic search were obtained by applying the Neighbor-Joining method to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach. Bootstrap proportions (BPs) were obtained from 1,000 pseudo-replicates. Bayesian Posterior Probabilities (BPPs) were calculated from 1,000 replicates using MrBayes 3.2.6 with the maximum likelihood method for 10 million generations.

### **Results and Discussion**

#### **Overall prevalence and ST diversity of *Blastocystis* spp. in two French zoos**

A total of 307 individual or mixed animal samples (Table 1) were collected in both French zoos from NHPs, Carnivora, Artiodactyla, Perissodactyla, Proboscidea, Rodentia, Chiroptera, Marsupialia, Aves, Crocodilia, Squamata, Testudines, and Insecta, then screened for the presence of *Blastocystis* spp. by qPCR. This sampling represented 161 species, only 18 of which were housed in both zoos, and covered a wide variety of mammalian and non-mammalian groups. At the time of this survey, fecal samples were obtained from 82% and 96% of animal species hosted in the La Palmyre and Lille zoos respectively. Of the 209 samples and 94 species tested at the La Palmyre Zoo, 75 (35.9%) and 41 (43.6%) respectively were positive for *Blastocystis* spp. At the Lille Zoo, the prevalence of the parasite was 24.5% (24/98) and 29.9% (20/67) among the samples and species screened respectively. Overall, 32.2% (99/307) of the animal samples and 37.9% (61/161) of the species tested in the present study were shown to be infected with *Blastocystis* spp. By comparison, such a high

## RESULTATS



prevalence of the parasite had been previously observed in two smaller-scale molecular studies conducted in Perth Zoo, Australia, with a different sampling of species. In the first Australian study, 68.2% of the 22 samples and 69.2% of the 13 species analyzed were positive for *Blastocystis* spp. [23]. This prevalence was slightly lower (52.3% of the 120 samples and 55.6% of the 36 species screened) in the second Australian study conducted more recently [25]. Still in Australia, 9/55 (16.4%) samples and 4/12 (33.3%) species tested at Taronga Zoo were identified via PCR as positive for the parasite [33]. Together, these molecular surveys all clearly show that *Blastocystis* spp. is an extremely common parasite colonizing a wide range of animal hosts kept in captivity in zoological gardens. However, this was not the conclusion of an epidemiological study conducted at a zoo of Kuala Lumpur, Malaysia, in which a total of 197 stool samples from 16 species of primates, 21 species of hoofed mammals and 9 feline species were tested for the presence of intestinal parasites, with only 2 samples collected from 2 primate species being described as positive for *Blastocystis* spp. [40]. To explain the low prevalence of the parasite in the Malaysian zoo, it should be emphasized that the identification of the parasite was performed using direct-light microscopy of fecal smears and formol ether concentration techniques, both methods being shown to be far less sensitive than PCR [38]. Moreover, the sensitivity of microscopy diagnosis is highly dependent on the experience of the observer and the optimization of the experimental protocol [4].

# RESULTATS

**Table 1. Animal samples collected from various hosts at the French zoos in Lille and La Palmyre**

Common name and systematics	Scientific name	Zoos <sup>a</sup>	Sample numbers <sup>b</sup>	Type of samples <sup>c</sup>	Sequence positive samples for <i>Blastocystis</i> sp.
<b>EUTHERIA</b>					
<b>PRIMATES</b>					
<b>Catarrhini</b>					
<b>Hominidae</b>					
Western gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>	LP	6	3 IS + 3 MS	4
Orangutan	<i>Pongo pygmaeus</i>	LP	3	3IS	3
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	LP	3	1 IS + 2 MS	2
<b>Hylobatidae</b>					
Lar gibbon	<i>Hylobates lar</i>	ZL	2	2 MS	2
Lar gibbon	<i>Hylobates lar</i>	LP	1	1 MS	0
Buff-checked gibbon	<i>Nomascus gabriellae</i>	LP	2	2 MS	2
Siamang	<i>Symphalangus syndactylus</i>	ZL	4	1 IS + 3 MS	4
<b>Cercopithecidae</b>					
Southern pig-tailed macaque	<i>Macaca nemestrina</i>	LP	3	3 MS	3
Mandrill	<i>Mandrillus sphinx</i>	LP	1	1 MS	1
Owl-faced monkey	<i>Cercopithecus hamlyni</i>	LP	2	1 IS + 1 MS	1
Roloway monkey	<i>Cercopithecus roloway</i>	LP	1	1 MS	1
L'Hoest's monkey	<i>Cercopithecus lhoesti</i>	LP	1	1 MS	1
De Brazza's monkey	<i>Cercopithecus neglectus</i>	LP	2	2 MS	2
Eastern black-and-white colobus	<i>Colobus guereza</i>	LP	3	1 IS + 2 MS	2
<b>Platyrrhini</b>					
<b>Cebidae<sup>d</sup></b>					
Brown capuchin	<i>Cebus apella</i>	ZL	1	1 MS	0
Golden-bellied capuchin	<i>Cebus xanthosternos</i>	LP	2	2 MS	0
Common squirrel monkey	<i>Saimiri sciureus</i>	LP	1	1 MS	0
Emperor tamarin	<i>Saguinus imperator</i>	ZL	1	1 MS	0
Emperor tamarin	<i>Saguinus imperator</i>	LP	2	2 MS	1
White-lipped tamarin	<i>Saguinus labiatus</i>	ZL	1	1 MS	0
Red-handed tamarin	<i>Saguinus midas</i>	LP	2	2 MS	0
Pied tamarin	<i>Saguinus bicolor</i>	LP	1	1 MS	0
Cotton-top tamarin	<i>Saguinus oedipus</i>	LP	1	1 MS	0
Golden-headed lion tamarin	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	LP	4	4 MS	3
Golden lion tamarin	<i>Leontopithecus rosalia</i>	LP	1	1 MS	0
Geoffroy's marmoset	<i>Callithrix geoffroyi</i>	ZL	1	1 MS	0
Geoffroy's marmoset	<i>Callithrix geoffroyi</i>	LP	1	1 MS	0
Pigmy marmoset	<i>Callithrix pygmaea</i>	LP	2	2 MS	0
Common marmoset	<i>Callithrix jacchus</i>	LP	1	1 MS	0
Goeldi's marmoset	<i>Callimico goeldii</i>	LP	2	2 MS	0
<b>Pitheciidae</b>					
White-faced saki	<i>Pithecia pithecia</i>	ZL	1	1 MS	1
<b>Strepsirrhini</b>					
<b>Lemnidae</b>					
Ring-tailed lemur	<i>Lemur catta</i>	ZL	1	1 MS	1
Ring-tailed lemur	<i>Lemur catta</i>	LP	4	4 MS	4
Red ruffed lemur	<i>Varecia rubra</i>	ZL	1	1 MS	1
Red ruffed lemur	<i>Varecia rubra</i>	LP	2	1 IS + 1 MS	2
Black-and-white ruffed lemur	<i>Varecia variegata</i>	ZL	1	1 MS	1
Black-and-white ruffed lemur	<i>Varecia variegata</i>	LP	3	1 IS + 2 MS	1
Black lemur	<i>Eulemur macaco</i>	LP	1	1 MS	1
<b>Lorisidae</b>					
Pygmy slow loris	<i>Nycticebus pygmaeus</i>	ZL	1	1 MS	0
<b>CARNIVORA</b>					
<b>Feliformia</b>					
<b>Felidae</b>					
Nothern lynx	<i>Lynx lynx</i>	LP	1	1 IS	0
Lion	<i>Panthera leo</i>	LP	1	1 IS	0
Cheetah	<i>Acinonyx jubatus</i>	LP	5	2 IS + 3 MS	1
Leopard	<i>Panthera pardus</i>	LP	2	2 IS	0
Snow leopard	<i>Panthera uncia</i>	LP	2	2 IS	0
Jaguar	<i>Panthera onca</i>	LP	2	2 IS	0
Tiger	<i>Panthera tigris</i>	LP	2	2 MS	0
<b>Viverridae</b>					
Binturong	<i>Arctictis binturong</i>	ZL	1	1 IS	0
<b>Herpestidae</b>					
Yellow mongoose	<i>Cynictis penicillata</i>	ZL	1	1 MS	0
Slender-tailed meerkat	<i>Suricata suricatta</i>	ZL	1	1 MS	0
Slender-tailed meerkat	<i>Suricata suricatta</i>	LP	2	2 IS	0

# RESULTATS

<b>Caniformia</b>					
<b>Canidae</b>					
Grey wolf	<i>Canis lupus</i>	LP	4	4 IS	1
African hunting dog	<i>Lycaon pictus</i>	LP	3	3 IS	0
Fennec fox	<i>Vulpes zerda</i>	LP	7	2 IS + 5 MS	0
<b>Ailuridae</b>					
Red panda	<i>Ailurus fulgens</i>	ZL	2	2 IS	0
Red panda	<i>Ailurus fulgens</i>	LP	2	2 IS	0
<b>Ursidae</b>					
Polar bear	<i>Ursus maritimus</i>	LP	3	3 IS	1
<b>Mustelidae</b>					
Oriental small-clawed otter	<i>Aonyx cinerea</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Procyonidae</b>					
Kinkajou	<i>Potos flavus</i>	ZL	1	1 IS	0
Brown-nosed coati	<i>Nasua nasua</i>	ZL	1	1 MS	0
Brown-nosed coati	<i>Nasua nasua</i>	LP	3	2 IS + 1 MS	0
<b>Otariidae</b>					
California sealion	<i>Zalophus californianus</i>	LP	6	6 IS	1
<b>ARTIODACTYLA</b>					
<b>Camelidae</b>					
Alpaca	<i>Vicugna pacos</i>	ZL	1	1 MS	1
Alpaca	<i>Vicugna pacos</i>	LP	5	5 MS	0
<b>Hippopotamidae</b>					
Hippopotamus	<i>Hippopotamus amphibius</i>	LP	1	1 IS	0
<b>Giraffidae</b>					
Giraffe	<i>Giraffa camelopardalis</i>	LP	6	6 IS	4
<b>Tragulidae</b>					
Java mouse-deer	<i>Tragulus javanicus</i>	ZL	1	1 MS	1
<b>Bovidae</b>					
Common eland	<i>Taurotragus oryx</i>	ZL	1	1 IS	1
Greater kudu	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	LP	2	2 MS	2
Bongo	<i>Tragelaphus eurycerus</i>	LP	1	1 MS	1
American bison	<i>Bison bison</i>	LP	3	3 IS	1
Blindled wildebeest	<i>Connochaetes taurinus</i>	LP	1	1 MS	1
Bontebok	<i>Damaliscus pygargus</i>	LP	1	1 MS	0
Beisa oryx	<i>Oryx beisa</i>	LP	4	4 MS	3
Scimitar-horned oryx	<i>Oryx dammah</i>	LP	5	5 IS	5
Goat	<i>Capra hircus</i>	LP	7	7 MS	1
Impala	<i>Aepyceros melampus</i>	LP	1	1 MS	0
<b>PERISSODACTYLA</b>					
<b>Equidae</b>					
Common zebra	<i>Equus burchellii</i>	ZL	2	1 IS + 1 MS	1
Common zebra	<i>Equus burchellii</i>	LP	2	2 IS	1
Grevy's zebra	<i>Equus grevyi</i>	LP	2	2 MS	0
African wild ass	<i>Equus asinus</i>	LP	2	2 MS	2
<b>Rhinocerotidae</b>					
White rhinoceros	<i>Ceratotherium simum</i>	ZL	2	2 IS	0
White rhinoceros	<i>Ceratotherium simum</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Tapiridae</b>					
South American tapir	<i>Tapirus terrestris</i>	ZL	1	1 IS	1
South American tapir	<i>Tapirus terrestris</i>	LP	2	2 IS	2
<b>PROBOSCIDEA</b>					
Asiatic elephant	<i>Elephas maximus</i>	LP	4	4 IS	3
<b>RODENTIA</b>					
House mouse <sup>e</sup>	<i>Mus musculus</i>	ZL	2	2 MS	0
Norway rat <sup>e</sup>	<i>Rattus norvegicus</i>	ZL	2	2 MS	1
Indian crested porcupine	<i>Hystrix indica</i>	ZL	2	2 IS	0
Patagonian mara	<i>Dolichotis patagonum</i>	ZL	3	3 MS	0
Capybara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	ZL	2	1 IS + 1 MS	1
Capybara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	LP	3	2 IS + 1 MS	2
<b>CHIROPTERA</b>					
Lyle's flying fox	<i>Pteropus lylei</i>	ZL	2	1 IS + 1 MS	0
Rodrigues flying fox	<i>Pteropus rodricensis</i>	LP	1	1 MS	1
Egyptian rousette	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	LP	1	1 MS	1
<b>MARSUPIALIA</b>					
Red kangaroo	<i>Macropus rufus</i>	LP	1	1 MS	0
Red-necked wallaby	<i>Macropus rufogriseus</i>	LP	1	1 MS	1
<b>AVES</b>					
<b>Galliformes</b>					
Crested wood partridge	<i>Rollulus rouloul</i>	ZL	1	1 MS	0
Common peafowl	<i>Pavo cristatus</i>	LP	2	2 IS	1

# RESULTATS

<b>Anseriformes</b>					
Bar-headed goose	<i>Anser indicus</i>	ZL	1	1 IS	0
Bar-headed goose	<i>Anser indicus</i>	LP	1	1 MS	0
Barnacle goose	<i>Branta leucopsis</i>	ZL	1	1 IS	0
Nene	<i>Branta sandvicensis</i>	ZL	2	2 IS	0
Mandarin duck	<i>Aix galericulata</i>	ZL	1	1 MS	0
Tufted duck	<i>Aythya fuligula</i>	ZL	1	1 MS	0
Ferruginous duck	<i>Aythya nyroca</i>	ZL	3	3 MS	0
Hottentot teal	<i>Anas hottentota</i>	ZL	1	1 MS	0
Black swan	<i>Cygnus atratus</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Psittaciformes</b>					
Twenty-eight parrot	<i>Barnardius zonarius</i>	ZL	1	1 MS	0
Grey parrot	<i>Psittacus erithacus</i>	ZL	1	1 MS	0
Senegal parrot	<i>Poicephalus senegalus</i>	ZL	1	1 MS	0
Burrowing parrot	<i>Cyanoliseus patagonus</i>	ZL	1	1 MS	0
Green-winged macaw	<i>Ara chloroptera</i>	ZL	1	1 MS	0
Green-winged macaw	<i>Ara chloroptera</i>	LP	4	4 MS	0
Buffon's macaw	<i>Ara ambigua</i>	LP	1	1 MS	0
Scarlet macaw	<i>Ara macao</i>	ZL	1	1 MS	0
Blue-and-yellow macaw	<i>Ara ararauna</i>	LP	4	4 MS	0
Hyacinth macaw	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	LP	1	1 MS	0
Blue-crowned conure	<i>Aratinga acuticaudata</i>	ZL	1	1 MS	0
Monk parakeet	<i>Myiopsitta monachus</i>	ZL	1	1 MS	0
Orange-winged amazon	<i>Amazona amazonica</i>	ZL	1	1 MS	0
Mealy amazon	<i>Amazona farinosa</i>	ZL	1	1 MS	0
Yellow-crowned amazon	<i>Amazona ochrocephala</i>	ZL	1	1 MS	0
Rosella	<i>Platycercus eximus</i>	LP	1	1 MS	0
Lesser sulphur-crested cockatoo	<i>Cacatua sulphurea</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Strigiformes</b>					
Snowy owl	<i>Bubo scandiacus</i>	ZL	1	1 MS	0
<b>Coraciiformes</b>					
Laughing kookaburra	<i>Dacelo novaeguineae</i>	ZL	2	2 MS	0
<b>Passeriformes</b>					
Javan sparrow	<i>Lonchura oryzivora</i>	ZL	1	1 MS	0
<b>Phoenicopteriformes</b>					
Chilean flamingo	<i>Phoenicopiterus chilensis</i>	LP	6	1 IS + 5 MS	0
American flamingo	<i>Phoenicopiterus ruber</i>	LP	3	3 MS	1
<b>Pelecaniformes</b>					
Scarlet ibis	<i>Eudocimus ruber</i>	LP	4	4 MS	0
<b>Accipitriformes</b>					
Rüppel's griffon vulture	<i>Gyps rueppellii</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Ciconiiformes</b>					
Marabou stork	<i>Leptoptilos crumeniferus</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Columbiformes</b>					
Nicobar pigeon	<i>Caloenas nicobarica</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Bucerotiformes</b>					
Southern ground-hornbill	<i>Bucorvus leadbeateri</i>	LP	1	1 IS	0
Trumpeter hornbill	<i>Bycanistes bucinator</i>	LP	1	1 MS	0
Great Indian hornbill	<i>Buceros bicornis</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Passeriformes</b>					
Bali mynah	<i>Leucopsar rotschildi</i>	LP	1	1 IS	0
<b>Gruiformes</b>					
Black crowned-crane	<i>Balearica pavonina</i>	LP	2	2 IS	0
<b>Sphenisciformes</b>					
Jackass penguin	<i>Spheniscus demersus</i>	LP	1	1 MS	0
<b>Ratites</b>					
Common ostrich	<i>Struthio camelus</i>	LP	2	2 MS	2
Greater rhea	<i>Rhea americana</i>	LP	3	3 IS	2
<b>CROCODYLIA</b>					
African slender-snouted crocodile	<i>Mecistops cataphractus</i>	LP	1	1 IS	0
<b>SQUAMATA</b>					
Green iguana	<i>Iguana iguana</i>	ZL	1	1 IS	1
Green iguana	<i>Iguana iguana</i>	LP	1	1 IS	0
Green anaconda	<i>Eunectes murinus</i>	LP	1	1 IS	0
Boa constrictor	<i>Boa constrictor</i>	ZL	1	1 IS	1
Cornsnake	<i>Pantherophis guttatus</i>	ZL	2	2 MS	0
Russian ratsnake	<i>Elaphe schrencki</i>	ZL	1	1 IS	0
Taiwan beauty snake	<i>Elaphe taeniura</i>	ZL	1	1 IS	0
Common kingsnake	<i>Lampropeltis getula</i>	ZL	2	2 IS	0
Milksnake	<i>Lampropeltis triangulum</i>	ZL	2	2 IS	0
<b>TESTUDINES</b>					
Aldabra tortoise	<i>Aldabrachelys gigantea</i>	ZL	1	1 IS	1
Aldabra tortoise	<i>Aldabrachelys gigantea</i>	LP	1	1 IS	0
Spur-thighed tortoise	<i>Testudo graeca</i>	ZL	1	1 IS	1

## RESULTATS

<i>INSECTA<sup>e</sup></i>					
Madagascar hissing cockroach	<i>Gromphadorhina portentosa</i>	ZL	3	3 IS	0
Giant cockroach	<i>Blaberus giganteus</i>	ZL	1	1 IS	1
Peppered roach	<i>Archimandrita tessellata</i>	ZL	1	1 IS	0
Dubia roach	<i>Blaptica dubia</i>	ZL	3	3 IS	1
Sun beetle	<i>Pachmoda marginata</i>	ZL	2	2 IS	0
Desert locust	<i>Schistocerca gregaria</i>	ZL	2	2 IS	1
Field cricket	<i>Gryllus bimaculatus</i>	ZL	5	5 IS	0

<sup>a</sup> ZL : Zoo of Lille ; LP : Zoo of La Palmyre

<sup>b</sup> Depending on the species, the samples were obtained either from a single individual or a group of individuals of the same species or both. In the case of insects, samples analyzed were the gastrointestinal tract of single individuals obtained after dissection. Only droppings of the desert locust were obtained and analyzed in addition to that of the gastrointestinal tract

<sup>c</sup> IS : Individual sample ; MS : Mixed sample

<sup>d</sup> According to Groves [41], the Cebidae includes the ancient family of Callitrichidae (marmosets and tamarins)

<sup>e</sup> Animals bred in the Lille Zoo and used as food for other animals

Of the 99 samples positive for *Blastocystis* spp. by qPCR from the two French zoos, 88 represented infections by a single ST according to the resulting sequence chromatograms. In the remaining 11 qPCR products, chromatogram analysis revealed the presence of double signals, suggesting mixed infections by different STs. Cloning of the non-qPCR product obtained from each of these 11 samples was then necessary for subtyping, and 5 positive clones were arbitrarily selected and sequenced for each cloning. Ten of the 11 samples showed mixed infection with two different STs, whereas the remaining sample harbored 3 different STs. Therefore, with the addition of 11 mixed infections consisting of either two or three different STs, a total of 111 *Blastocystis* spp. isolates were subtyped and analyzed in this study. 102 of the corresponding 111 SSU rDNA gene sequences showed 96% to 100% identity to representative sequences of the 17 mammalian and avian *Blastocystis* spp. STs reported so far [19], allowing the direct subtyping of these isolates (Table 2). Of these 17 STs, 11 (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST8, ST10, ST13, ST14 and ST15) were identified, with varying prevalence between animal groups as detailed below, highlighting the large genetic diversity observed between *Blastocystis* spp. isolates from animals. To a lesser extent, a wide range of mammalian and avian STs was also previously described in several smaller-scale surveys conducted in zoological gardens [19,24,25,33].



# RESULTATS

**Table 2. Subtype results from sequence-positive samples for *Blastocystis* spp.**

Host	Zoos <sup>a</sup>	Sequences	<i>Blastocystis</i> sp. STs																	NMASTs <sup>b</sup>
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
<b>EUTHERIA</b>																				
<b>PRIMATES</b>																				
Western gorilla	LP	4	1	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Orangutan	LP	3	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Chimpanzee	LP	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lar gibbon	ZL	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
Siamang	ZL	4	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Buff-checked gibbon	LP	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Southern pig-tailed macaque	LP	4	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mandrill	LP	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Owl-faced monkey	LP	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Roloway monkey	LP	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L'Hoest's monkey	LP	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
De Brazza's monkey	LP	3	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Eastern black-and-white colobus	LP	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Emperor tamarin	LP	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Golden-headed lion tamarin	LP	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
White-faced saki	ZL	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ring-tailed lemur	LP	4	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ring-tailed lemur	ZL	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Red ruffed lemur	LP	4	1	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Red ruffed lemur	ZL	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Black-and-white ruffed lemur	LP	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Black-and-white ruffed lemur	ZL	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Black lemur	LP	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>48</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	
<b>CARNIVORA</b>																				
Cheetah	LP	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Grey wolf	LP	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Polar bear	LP	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
California sea lion	LP	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>ARTIODACTYLA</b>																				
Alpaca	ZL	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Java mouse-deer	ZL	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
Giraffe	LP	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	4	-	-	-	-	
Common eland	ZL	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
Greater kudu	LP	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bongo	LP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
American bison	LP	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	
Blindled wildebeest	LP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
Beisa oryx	LP	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	
Scimitar-horned oryx	LP	5	-	-	1	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	
Goat	LP	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>24</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>14</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>PERISSODACTYLA</b>																				
Common zebra	LP	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Common zebra	ZL	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
African wild ass	LP	3	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
South American tapir	LP	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
South American tapir	ZL	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>8</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	
<b>PROBOSCIDEA</b>																				
Asiatic elephant	LP	5	3	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>5</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>RODENTIA</b>																				
Capybara	LP	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Capybara	ZL	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Norway rat	ZL	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>4</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	
<b>CHIROPTERA</b>																				
Rodrigues flying fox	LP	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Egyptian rousette	LP	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>MARSUPIALIA</b>																				
Red-necked wallaby	LP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	
<b>AVES</b>																				
Common peafowl	LP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
American flamingo	LP	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Common ostrich	LP	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Greater rhea	LP	3	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>7</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	
<b>SQUAMATA</b>																				
Green iguana	ZL	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Boa constrictor	ZL	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<b>Total</b>		<b>2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	
<b>TESTUDINES</b>																				
Aldabra tortoise	ZL	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Spur-thighed tortoise	ZL	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
<b>Total</b>		<b>3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	
<b>INSECTA</b>																				
Giant cockroach	ZL	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dubia roach	ZL	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Desert locust	ZL	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>		<b>3</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
<b>Grand total</b>		<b>111</b>	<b>20</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

<sup>a</sup> ZL : Zoo of Lille ; LP : Zoo of La Palmyre

<sup>b</sup> Non Mammalian and Avian STs

## RESULTATS

The remaining nine SSU rDNA gene sequences obtained in the present study from eight *Blastocystis* spp. isolates exhibited 82% to 92% identity with homologous sequences available in databases, thus preventing direct subtyping of the corresponding isolates. Consequently, these sequences were added to an existing database including 55 homologous sequences from representatives of both mammalian/avian STs and so-called NMASTs, then applied to a phylogenetic analysis in order to clarify their relationships (Fig 1). With the exception of ST13 and ST17 (only one representative isolate), all mammalian and avian STs were represented by 2 to 4 isolates. In the ML *Blastocystis* spp. tree, almost all mammalian and avian STs included in the analysis formed monophyletic lineages strongly supported by BP and BPP values. Only the two ST14 isolates represented a paraphyletic clade. Interestingly, even if this tree was reconstructed from short-length SSU rDNA gene sequences, some groupings were consistent with those described in previous phylogenetic analyses based on full-length sequences of the same gene [20]. This was the case of two large clades uniting with strong robustness ST1, ST2, ST5, ST13 and ST14 (BP and BPP of 61% and 0.99 respectively) as well as ST6, ST7 and ST9 (BP and BPP of 99% and 1 respectively). ST3, ST4, ST8 and ST10 also grouped together, but this clustering was not supported by BP and BPP values (below 50% and 0.5 respectively). The 22 isolates obtained from non-mammalian and avian hosts in previous studies and included in the phylogenetic reconstruction were shown to exhibit a large genetic diversity and are thus classified in eight clades called NMAST I to NMAST VIII, three of which (NMASTs IV, V and VII) are represented by only a single isolate. Three of these clades (NMASTs I, II and III) were recently proposed as potential novel STs [20]. NMASTs I to V and NMAST VII represented reptilian clusters, while NMAST VI was composed only of insect isolates and NMAST VIII of both amphibian and reptilian isolates. Curiously, an additional isolate identified through the microbiota analysis of a wild western lowland gorilla [42] emerged within the reptilian NMAST II, suggesting highly probable accidental contamination of the primate with reptile feces in its natural environment. Concerning the 9 sequences obtained in the present study and exhibiting low identity with the homologous sequences available in databases, 2 of them, LPA10 and ZLB10, were also grouped with the reptilian clade NMAST II in our phylogenetic analysis, while the corresponding isolates colonized capybara (rodents) and zebra (perissodactyls) respectively. Moreover, the sequence LPO12 from the bird peafowl formed a sister group with the reptilian/amphibian NMAST VIII sequences supported by BPP of 0.75. Here too, an accidental contamination of these three hosts with reptilian or amphibian feces was highly probable. Three other sequences obtained from the reptiles Aldabra tortoise

## RESULTATS

(ZLB27), spur-thighed tortoise (ZLC1 clone 2) and boa constrictor (ZLC7) could also be assigned to the reptilian NMAST II clade. A second sequence obtained from spur-thighed tortoise (ZLC1 clone 1) and the sequence ZLB30 from green iguana showed sister group relationships with the only representative of the reptilian NMAST IV (BP and BPP of 60% and 0.94 respectively) and NMAST V (BPP of 0.67) respectively. Regarding the emergence of the LPA3 sequence obtained from wallaby, it remained to be clarified, since it is poorly supported within a large group including NMAST V and various mammalian STs. Overall pending further phylogenetic analyses of longer SSU rRNA gene sequences to clarify the emergence of these 9 isolates, all have for now been affiliated with NMASTs.

**Fig 1. Unrooted maximum likelihood tree based on SSU rDNA gene sequences depicting relationships between *Blastocystis* spp. isolates.** The numbers at the node indicate BPs and BPPs respectively, given by ML and Bayesian analyses with 1,000 replicates. The asterisks designate nodes with BPs or BPPs below 50% or 0.5. The sequences obtained in this study are shown in bold.

### **Prevalence of *Blastocystis* spp. in mammalian groups housed in French zoos**

In our epidemiological survey, NHPs were the most represented animal group, with a total of 73 samples collected in the two French zoos (Table 1). These samples covered 39 species (with 6 species common to both zoos) belonging to 7 NHPs families, including Hominidae (3 species), Hylobatidae (4 species), Cercopithecidae (7 species), Cebidae [41] (16 species), Pitheciidae (1 species), Lemuridae (7 species), and Lorisidae (1 species). Strikingly, 60.3% (44/73) of the NHP samples and 59.0% (23/39) of the NHP species tested in both French zoos were positive for *Blastocystis* spp. Such a high prevalence of the parasite was also previously reported in different NHP families in various countries and habitats. Limiting ourselves to the most recent literature focusing on NHP cohorts of significant size, the prevalence of *Blastocystis* spp. reached 87.6% in a population of 443 captive cynomolgus macaques (Cercopithecidae) housed in biomedical research centers in Italy [43], 60.4% in a group of 96 mantled howler monkeys (Atelidae) from a reserve in Ecuador [44], and 51.3% and 49% in wild chimpanzee (Hominidae) communities living in the savanna area of Ugalla in Tanzania [45] and the Cantanhez National Park in Guinea-Bissau [46] respectively. A high prevalence of the parasite was also observed in large groups of chimpanzees (71.4%), but also vervet (84.7%) and colobus (83.7%) monkeys (Cercopithecidae), all three species living on Rodondo

## RESULTATS

Island in Tanzania [34]. Interestingly, more than half of the primate species housed in Perth Zoo in Australia [25], around 92% of the NHP species tested at the Osaka city zoo in Japan [47], and numerous captive primate species from animal facilities, zoos and sanctuaries in various countries [24,32] were also shown to be infected with *Blastocystis* spp. From all these data, and as confirmed in the present study, NHPs clearly represent common hosts of the parasite, regardless of their lifestyle and geographical origin.

The group of Carnivora was widely sampled in the present study (Table 1). However, only 4 of the 53 samples (7.5%) tested and obtained from 22 species (with 3 species common to both zoos) were positive for *Blastocystis* spp. by qPCR. The four species (18.2%) infected with the parasite, namely cheetah, grey wolf, polar bear and California sealion, were all housed at the La Palmyre Zoo and, to our knowledge, had never yet been described as hosts of *Blastocystis* spp. Such low parasite prevalence in carnivores living in captivity was previously observed, for instance, at the Osaka city zoo in Japan where none of the 11 species tested were infected [47]. The parasite was also absent in the 7 carnivore species of different geographical origins investigated by Alfellani et al. [19]. Until now, epidemiological surveys of Carnivora focused mostly on Canidae and more generally on various dog populations from different countries. In the large majority of published surveys, canine fecal samples were either found to be negative for *Blastocystis* spp. [23,47-49] or infected by the parasite with a low or moderate prevalence ranging between 1.3% and 14.5% [37,50-54]. However, in some studies mainly focused on stray dogs living mostly in areas of poor sanitation and hygiene, the prevalence of *Blastocystis* spp. was significantly higher [6,51].

In the animal groups studied in the present survey, Artiodactyla have also been extensively sampled, since 40 samples were collected from 15 species (with 1 species common to both zoos) belonging to Camelidae (2 species), Hippopotamidae (1 species), Giraffidae (1 species), Tragulidae (1 species) and Bovidae (10 species) (Table 1). In numerous epidemiological studies including artiodactyls, sampling was mainly focused on domestic Bovidae and Suidae living in farms or zoological gardens in close contact with humans and whose feces could easily be collected from a large number of individuals [6,19,23-26,28,30,33,35,36,47,55-57]. Of the 40 samples and 15 species screened in our study from artiodactyls, 21 (52.5%) and 11 (73.3%) respectively were positive for *Blastocystis* spp. by qPCR. Interestingly, 8 of the 10 bovid species tested (80%) were shown to be infected by the parasite, which was in agreement with previous studies in which *Blastocystis* spp. were mentioned as a common parasite in Bovidae. Indeed, the prevalence of the parasite reached 71% and 80% in cattle in Japan [47] and Colombia [6] respectively, and was over 30% in

## RESULTATS

goats in Malaysia [55]. The highly endemic status of *Blastocystis* spp. in Artiodactyla was also confirmed with a prevalence of 87.1% and 95% observed in cohorts of domestic pigs in Indonesia [57] and Japan [47] respectively. In addition, 76.7% and 46.8% of pigs from commercial intensive piggeries in Australia [30] and Spain [35], together with 45.2% of pigs from a village in rural Cambodia [30], were positive for the parasite.

Regarding other mammalian groups included in the present study, the number of samples collected was more limited than for the NHPs, Carnivora and Artiodactyla. Indeed, a total of 14 samples were collected from Perissodactyla, representing 8 species (3 of which were common to both zoos), 4 samples from Proboscidea representing a single species (Asian elephant), 14 samples from Rodentia (6 species represented, one of which was common to both zoos), and 4 samples from 3 species of Chiroptera (Table 1). The prevalence of species infected with *Blastocystis* spp. in these animal groups was very high and reached 62.5% (5/8 species) in perissodactyls, 100% (1/1) in proboscideans, 50% (3/6) in rodents, and 66.7% (2/3) in bats. Very few epidemiological surveys have been conducted to date among these 4 animal groups, as summarized by Alfellani et al. [19], and consequently, any comparison in term of the prevalence between cohorts of the same animal group remains insignificant.

Finally, two species (red kangaroo and red-necked wallaby) belonging to the mammalian infraclass Marsupialia, both housed at the La Palmyre Zoo, were also screened for the presence of *Blastocystis* spp. Only one of the two (red-necked wallaby) (50%) was shown to be positive for the parasite. In comparison, 62.5% and 52.6% of the samples obtained from opossums in Colombia [6] and 7 species of marsupials in Australia [33] respectively were infected by *Blastocystis* spp.

### **Prevalence of *Blastocystis* spp. in non-mammalian groups housed in French zoos**

In the present survey, birds were the most widely represented among non-mammalian animals, with a total of 70 individual or mixed animal samples collected in the two French zoos (Table 1). These samples represented 45 species (with 2 species common to both zoos) belonging to 16 avian orders. Within this broad and highly diversified sampling, the overall prevalence of *Blastocystis* spp. in birds was very low at 8.6% (6/70) of the samples and 8.9% (4/45) of the species tested were positive for the parasite. Only one galliform (peafowl), one phoenicopteriform (American flamingo), and two ratite (ostrich and greater rhea) species were thus shown to be infected by *Blastocystis* spp. and were all housed at the La Palmyre

## RESULTATS

Zoo. No positive cases were identified in birds at the Lille Zoo. In term of prevalence of the parasite, these data strongly contrast with almost all previous surveys focused on birds. Indeed, studies conducted in Japanese zoos [45,58] and including pheasants, ducks, chickens and ostriches, revealed a very high prevalence of *Blastocystis* spp. ranging from 56% to 100%, depending on the avian group tested. Similarly, 90% of the samples screened from 5 wild bird species in Colombia were shown to be infected by *Blastocystis* spp. [6]. The parasite was also present in 75% to 100% of domestic chickens, ducks, and geese, and commercially farmed ostrich samples collected in Australia [59], and in approximately 95% of chickens reared on 4 Australian farms [60]. The prevalence of the parasite also reached 34% in a cohort of domestic chickens in an Indonesian community [57], and 32.9%, 46.6%, and 23.9% in chickens, ducks and quails respectively, sold at municipal markets in Brazil [61], and 58% and 100% of ostriches screened on European [62] and Malaysian [63] commercial farms respectively. It remains difficult to compare the avian parasite prevalence observed in the present study with that of previous surveys, since they were conducted on different populations of zoo, wild or farmed birds, in various geographical areas and using different detection methods. However, strict hygiene conditions coupled with individual housing of the majority of bird species in both French zoos likely explains the limitation of *Blastocystis* spp. infection in this animal group.

Another large group of vertebrates analyzed in this study was that of reptiles, including the three orders Crocrodilia, Squamata, and Testudinata. A total of 16 reptilian samples were collected in the two French zoos (Table 1). These samples covered 1 species of Crocrodilia, 9 species of Squamata (with 1 species common to both zoos), and 3 species of Testudinata (with 1 species common to both zoos). *Blastocystis* spp. were not detected in Crocrodilia, but were found in Squamata and Testudinata in 2/12 (16.7%) and 2/3 (66.7%) respectively of the samples tested, suggesting that the parasite is common in reptiles. Previous studies reinforce this hypothesis, since the prevalence of *Blastocystis* spp. was shown to be 28.6% among 28 species of reptiles housed at the Singapore zoological gardens [64] and 7% among house lizards captured in Kuala Lumpur, Malaysia [65]. Moreover, although this group of animals cannot be sampled easily, parasite isolates were also characterized in various reptilian species [66-68].

Finally, the last group of animals sampled in this study was that of insects, all housed at the Lille Zoo. A total of 17 samples were obtained from 7 different species belonging to the orders Blattodea (*Gromphadorhina*, *Blaberus*, *Archimandrita* and *Blaptica*), Coleoptera (*Pachnoda*) and Orthoptera (*Schistocerca* and *Gryllus*), and three of them (42.9%) were

## RESULTATS

shown to be positive for *Blastocystis* spp. The first study describing the parasite and its prevalence in insects was by Zaman et al. [69], who identified *Blastocystis* spp. in 80% of 10 cockroaches belonging to the species *Periplaneta americana* and caught from sewage tanks in Singapore. A lower prevalence (10%) of the parasite was found by Suresh et al. [65] in a group of 30 individuals of the same cockroach species, but caught in dwellings in Malaysia. Additional isolates were also obtained from *P. americana* by Yoshikawa et al. [68]. On the other hand, *Blastocystis* spp. was unsuccessfully identified in houseflies belonging to the insect order Diptera [65].

### **ST distribution of *Blastocystis* spp. in animal groups and risk assessment of zoonotic transmission**

The first findings of the large-scale study described above have expanded our knowledge on the prevalence of *Blastocystis* spp. in a variety of animal groups. Through the subsequent molecular identification of all these animal isolates, this survey could also help evaluate the zoonotic potential of the parasite. Indeed, overlapping of STs, coupled with necessary high similarity or even identity of SSU rDNA gene sequences between human and animal isolates, highlights the transmission between hosts as reported in recent surveys [27-29]. In several recent epidemiological studies [6,32], alleles were assigned to SSU rDNA gene sequences spanning the barcode region designed by Scicluna et al. [73] and compared between human and animal isolates to investigate zoonotic transmission. Because of its length, this longer domain of the SSU rDNA gene (around 600 bp) is not applicable to the qPCR assay used in the present study that requires a routine screening of a large number of samples. Consequently, the SSU rDNA region sequenced in our survey did not cover the entire domain necessary for allele assignment.

Among the 44 NHPs samples that were sequence-positive for *Blastocystis* spp. by qPCR, 3 sequences traces clearly represented mixed ST infections. Indeed, two different STs colonized southern pig-tailed macaque and De Brazza's monkey, and three STs infected red ruffed lemur. These three primate species were all housed at the La Palmyre Zoo. Therefore, a total of 48 isolates were subtyped from NHP samples (Table 2) and the corresponding sequences belonged to ST1 (31.2%), ST2 (18.7%), ST3 (16.7%), ST4 (8.3%), ST5 (14.6%), ST7 (4.2%), ST8 (4.2%) and ST15 (2.1%). This ST distribution was roughly similar to that compiled from all molecular data currently available from captive and wild NHPs (Table 3), especially with a large predominance of ST1 to ST3. Indeed, these three STs represented

## RESULTATS

around 67% of the isolates identified in NHPs in the present study. The only minor differences compared to the compiled data were the higher prevalence of ST4 and ST5 and the lower prevalence of both ST7 and ST8 in our survey. As previously stated by Alfellani et al. [32], the concordance in the distribution of STs across epidemiological studies conducted in NHPs suggest strongly that predominant ST1 to ST3 are shared by captive and wild monkeys and thus naturally occur in this host group. Interestingly, the evolutionarily closely related NHP and human groups share a high prevalence of the parasite and the same predominance of ST1 to ST3 among isolates. Moreover, 32 of the 48 (66.7%) sequences of isolates belonging to ST1 to ST3 identified from NHPs in the present study were shown to be 100% identical to homologous sequences available in databases from humans. Similarly, the sequences of one of the four ST4 isolates and of the two ST8 isolates from NHPs also exhibited 100% identity with those of humans. In contrast, the sequences of NHP isolates belonging to ST7 and ST5 were 98 and 97% similar respectively compared to those from humans. Therefore, the genetic identity of ST1 to ST4 and ST8 isolates from NHPs and humans, together with the high prevalence rate of *Blastocystis* spp. in primates, strongly suggests that NHPs might serve as a reservoir for human infection, in particular for ST1 to ST3 (Fig. 2). To reinforce this statement, the zoonotic potential of NHP isolates was previously demonstrated by Yoshikawa et al. [27], in which rhesus monkeys and children living in the same area of Nepal shared ST2 isolates with identical sequences. For these authors, poor sanitary infrastructure might cause the contamination of the food and water supply by NHP feces. In another study, Stensvold et al. [24] showed the frequent infection of primate handlers by ST8 in the United Kingdom, while this ST is rarely found in humans but is common in NHPs. Daily contact with NHP feces in the course of their work was the most likely hypothesis proposed by the authors to explain the acquisition of ST8 infection by zookeepers. Moreover, *Blastocystis* spp. isolated from zookeepers at Perth Zoo, Australia, were also found to be identical to some isolates from NHPs, which are clustered in the same ST1 [23]. Although the risk of transmission of the parasite from NHPs to humans seems well evidenced, it is probably rather limited, because these two host groups are living in different ecological niches, strongly preventing possible contact. Consequently, the zoonotic transmission of *Blastocystis* spp. from NHPs may occur mainly in zoos and animal sanctuaries, as suggested previously [32].





# RESULTATS

Ratites	0	2	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[63]
	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Present study
Unidentified	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[19]
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>25</b>	<b>75</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>30</b>
<i>SQUAMATA</i>																				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[67]
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>0</b>
<i>TESTUDINATA</i>																				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>0</b>
<i>AMPHIBIA</i>																				
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>INSECTA</i>																				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
<b>Grand total excluding humans</b>	<b>526</b>	<b>259</b>	<b>238</b>	<b>55</b>	<b>468</b>	<b>68</b>	<b>153</b>	<b>109</b>	<b>0</b>	<b>90</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>116</b>

<sup>a</sup> Non Mammalian and Avian STs

<sup>b</sup> Including Atelidae and Pitheciidae

<sup>c</sup> Including Tragulidae, Giraffidae and Camelidae

<sup>d</sup> Including Phoenicopteriformes

## Figure 2. Comparison of the distribution and relative prevalence of *Blastocystis* spp. STs in humans and major animal groups and evaluation of potential zoonotic risk.

Histograms showing the prevalence of each ST as a percentage were obtained from the total values summarized in Table 3 for humans and the four most sampled animal groups, including NHPs, artiodactyls, carnivores, and birds. In the case of artiodactyls, the data were presented globally for this animal group, but also separately for Bovidae and Suidae. The arrows indicate possible zoonotic transmission by various boxed *Blastocystis* spp. STs predominant in these animal groups. NMAST = Non Mammalian and Avian ST; MU = Mixed ST / untypable.

The group of carnivores is of great interest since it covers most pets (domestic cats and dogs) that, due to their close contact with humans, may represent a potential source of zoonotic transmission of *Blastocystis* spp. The four isolates from carnivores identified in French zoos belonged to ST1, ST2 and ST3 (two isolates) (Table 2) and their sequences showed 100% identity with those of humans, with the exception of one ST3 isolate whose sequence was shown to be 99% similar. Interestingly, these three STs are predominant in this animal group according to the data compiled in previous studies (Table 3) as well as in humans, suggesting possible cross-transmission between these hosts. However, to our knowledge, only three recent papers focusing on domestic dogs and their owners in various countries showed a potential relationship between carnivore carriers and human infection through ST concordance [29,54,74]. In addition, the low to moderate prevalence of *Blastocystis* spp. observed in numerous canine cohorts [37,49,51,52,54], together with the

## RESULTATS

absence of a dog-specific/predominant ST, strongly suggest that dogs are unlikely to be natural hosts of *Blastocystis* spp. The recent study by Wang et al. [51] confirmed this hypothesis by demonstrating that stray dogs in India showed both greater diversity of STs and a higher prevalence of the parasite than domestic dogs in Australia and Cambodia. For the authors, dogs may be transiently and opportunistically infected by *Blastocystis* spp. via coprophagia, and the higher prevalence and larger ST diversity observed in stray dogs compared to domestic dogs could be attributed to greater exposure to fecal material from human and non-human hosts in their environment. Consequently, and in agreement with the present data, carnivores and especially Canidae do not seem to represent a significant source of *Blastocystis* spp. infection in humans [37,51].

Regarding artiodactyls, only representatives of Bovidae were sampled in our survey. Of the 21 samples sequence-positive for *Blastocystis* spp. by qPCR in this animal group, three presented mixed infections by two different STs (all with ST10 and ST14). Therefore, a total of 24 isolates were subtyped, and more than half of them (58.3%) belonged to ST10 (Table 2). The remaining isolates were identified as ST14 (33.3%), ST13 (4.2%) and ST3 (4.2%). Interestingly, three of the four families of Artiodactyla screened in our study were infected by ST10 and/or ST14. The fourth family, Tragulidae, was represented by a single species (Java mouse-deer) at the Lille Zoo, which was infected by ST13. However, this very rare ST was also described in a mouse deer from UK [19]. Strikingly, the distribution of STs in Bovidae in the present study was highly similar to that obtained by Fayer et al. [36] from cattle feces in the USA, in which all isolates identified belonged to either ST10 or ST14. Cattle from the USA were also shown to be infected only with ST10 [26], which was also the predominant ST in cohorts of cattle in Denmark [24], the UK and Libya [19]. All this worldwide data, together with those of the current study, strongly suggest that Bovidae may be natural hosts of *Blastocystis* spp. ST10 and ST14 (Table 3). Despite common exposure of humans to bovids, for instance livestock, both STs have never yet been reported in humans (Fig 2). In addition to ST10 and ST14, ST1 was also described in bovids, especially in goats [55] and cattle [6] with high prevalence (Table 3), but the search for the potential transmission of bovid ST1 isolates to human remains poorly documented. Still among artiodactyls, representatives of Suidae could not be sampled in the present study, because they are not housed in the two French zoos. However, this animal group was shown to be frequently infected, primarily by ST1 and ST5, suggesting that pigs are likely to be natural hosts of these *Blastocystis* spp. STs [24,30,35,57] (Table 3). The potential of pigs to act as zoonotic reservoirs was recently demonstrated by Wang et al. [30], who found an unusually high prevalence of ST5 in both

## RESULTATS

pigs and piggery staff in Australia, as well as sequence identity of ST1 and ST5 isolates from pigs and piggery workers. Therefore, close contact between pigs and their handlers may clearly increase the risk of zoonotic transmission of *Blastocystis* spp. ST1 and ST5 (Fig 2).

For other mammalian groups, the current data are too limited to draw conclusions about a potential risk of zoonotic transmission, and the present study only reinforces the currently available databases. In Perissodactyla, since 1 mixed infection by 2 STs was identified from a Poitou donkey, 8 isolates in total have been subtyped, and mostly belonged to ST3 (5/8 isolates) (Table 2). One isolate belonging to ST2 was also identified in the Poitou donkey, as well as one isolate described as ST5 in the South American tapir. A last isolate belonged to NMAST in the common zebra (isolate ZLB10) (Fig 1). In previous studies, the only two Perissodactyla isolates subtyped so far in a black rhinoceros and a horse corresponded to ST5 and ST1 sequences respectively [19] (Table 3). In Proboscidea, 5 isolates were subtyped from Asiatic elephants, since two samples presented mixed infections by two STs. All the isolates belonged to ST1 or ST3 (Table 2), while previous isolates identified and subtyped from captive elephants housed in Australian and European zoos or wild animals in Australia were all shown to belong to ST11 [25,33] (Table 3). In rodents, 4 isolates were subtyped in the present study and belonged to ST2, ST4, ST5, and NMAST (isolate LPA10) (Table 2 and Fig 1). Interestingly, ST2 was previously identified in wild rats in Colombia [6], while ST4 was the only ST identified in wild rats in Indonesia [55]. Rodents were previously proposed to be a reservoir of ST4, but the present study, as well as the study by Alfellani et al. [19], confirmed that other STs can be found in this host group. Regarding bats, two ST3 isolates were identified in the Rodrigues flying fox and Egyptian fruit bat (Table 2), both belonging to Pteropodidae and housed at the La Palmyre Zoo. To our knowledge, this is the first identification of *Blastocystis* spp. in Chiroptera. Among marsupials, one of the two samples tested was shown to be infected by an isolate for the time being classified as NMAST. Only a few previous surveys reported ST4, ST8, ST12 and ST13 in this animal group [6,24,25,33,47] (Table 3). Overall, more intensive sampling should be performed in these five as yet underrepresented mammalian groups, with the aim of confirming that each of them represents the natural host of the parasite and, if so, to assign a specific ST to these hosts.

Regarding non-mammalian groups, birds have already been considered as potential reservoirs of *Blastocystis* spp. transmission to humans [19,22,24]. Indeed, birds usually host ST6 and ST7, which are considered “avian STs” because of their predominance in this host group (about 82% of all avian isolates subtyped so far), as shown in Table 3. Thus, these two

## RESULTATS

rare STs in humans, accounting for around 9% of the human samples across the world according to Alfellani et al. [21], were suggested to be of zoonotic origin, as supported by the high similarity or even identity of SSU rRNA gene sequences between human and avian isolates [22] (Fig. 2). Nevertheless, of the 6 avian isolates characterized in the present study, none were identified as belonging to the “avian” ST6 or ST7. Three of them belonged to ST5, two to ST4, one to ST1, and the last one to NMAST (Table 2), suggesting that other STs can occasionally infect this host group. As stated above, the prevalence of *Blastocystis* spp. was very low among birds in both French zoos, which could easily be explained by the daily cleaning of cages and the small number of animals per cage. On the other hand, the prevalence of the parasite was shown to be very high in poultry flocks on commercial farms, due to high population density [60,61]. Therefore, to clarify the impact of zoonotic transmission from poultry, an epidemiological survey should be conducted promptly among the staff of these commercial farms who work in close contact with animals.

Among reptiles, 1 mixed infection by 2 STs was found in a spur-thighed tortoise. A total of 5 isolates were thus subtyped from this animal group (Table 2), and all were shown to belong to various NMASTs (Fig 1). Interestingly, all sequences obtained so far from reptilian isolates were also derived from NMASTs (Table 3). This strongly suggested that NMASTs could be specific to this animal group and are only occasionally found in other hosts, including mammals through accidental contamination as hypothesized in the present study for several species.

Finally, the 3 insect isolates subtyped in the present study belonged to ST2 (2 isolates) and ST3 (Table 2), which are commonly found STs in other animal groups and humans (Table 3). In addition, the three isolates showed 98 to 99% identity with human and various animal isolates, suggesting accidental contamination of insects by animal or human feces. Indeed, these subtyping data strongly contrast with those obtained previously by Yoshikawa et al. [58] regarding four *Blastocystis* spp. isolates identified in cockroaches and belonging to NMAST (Fig 1). As very little data are currently available for insects, the predominance of NMAST in this animal group remains to be confirmed by sampling additional taxonomic groups of this diversified class of organisms.

## Conclusions

To our knowledge, the present study represents the widest epidemiological survey ever conducted to increase our knowledge of the role of various animal groups in the epidemiology

## RESULTATS



of *Blastocystis* spp. Overall the parasite was commonly identified in animals housed in two French zoos, with varying prevalence from one host to another. Even though the data were generated from zoo animals and should be interpreted with caution, the findings in widely sampled groups including NHPs showed a roughly similar ST distribution in captive and wild animals. By combining our molecular data with data obtained in previous surveys and comparing the summarized overall ST distribution between animals and humans, it appears that NHPs and artiodactyls, especially livestock, could represent potential reservoirs of zoonotic transmission of *Blastocystis* spp. (Fig 2). Regarding other mammalian groups such as carnivores, perissodactyls, proboscids, rodents, bats and marsupials, their lower sampling currently prevents any assignment of host-specific STs and the evaluation of zoonotic risk, while knowing that close intimate association with animals increases the risk of acquiring *Blastocystis* spp. infection. Moreover, since most of these mammalian groups were shown to be frequently infected by STs commonly found in humans, the direction of transmission cannot be established with any certainty. In the case of non-mammalian groups, insects and reptiles are generally infected by NMASTs that are only found accidentally in other animal groups. Moreover, even if *Blastocystis* spp. were sporadically identified in birds in both French zoos, the high prevalence of the parasite in poultry from commercial farms, combined with the avian specificity of ST6 and ST7 and the identification of both STs in humans, strongly suggest that birds play a still probably underestimated role as a major reservoir for zoonotic transmission (Fig 2). These data also stress the importance of screening other hosts of *Blastocystis* spp. in order to complete the epidemiology of this parasite. For instance, a single study dating back over 20 years identified the parasite in fish [75], and the detection of *Blastocystis* spp. was only recently described in marine mollusks [76]. Even if these surveys extend the known host range of the parasite, molecular data is lacking for these hosts, although they could represent potential sources of zoonotic transmission through their raw consumption and / or handling. Finally, this epidemiological survey also provides necessary information for taking preventive and control measures that should help to reduce the burden of *Blastocystis* spp. in zoos and the risks of zoonotic transmission to animal handlers.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Géraldine Cassiat-Morrisset and all those who participated in the study, in particular the technical and administrative staff of the Lille and La Palmyre Zoos.

## *Author Contributions*

**Conceptualization:** EV AC DES MO GC.

**Formal analysis:** EV LLL SM CN.

**Funding acquisition:** EV.

**Investigation:** AC DES MO PDV NG SBV KG PP CN IW FD MC.

**Methodology:** EV GC.

**Project administration:** EV.

**Resources:** RM SB TP.

**Software:** LLL SM CN.

**Supervision:** EV GC.

**Validation:** EV.

**Data curation:** EV AC DES MO GC.

**Visualization:** EV AC DES MO GC.

**Writing - original draft:** EV AC DES MO GC.

**Writing - review & editing:** EV GC.

## References

1. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008; 21: 639-665.
2. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. Adv Parasitol. 2013; 82: 1-32.
3. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: a personal view. Parasitol Int. doi: 10.1016/j.parint.2016.05.015.
4. Bart AEM, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, et al. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. BMC Infect Dis. 2013; 13: 389.
5. El Safadi D, Cian A, Nourrisson C, Pereira B, Morelle C, Bastien P, et al. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. BMC Infect Dis. 2016; 16: 451.
6. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. Infect Genet Evol. 2014; 22: 223-228.

## RESULTATS

7. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. BMC Infect Dis. 2014; 14: 164.
8. Ajjampur SSR, Tan KSW. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. Parasitol Int. 2016; doi: 10.1016/j.parint.2016.05.007.
9. Andersen LO, Stensvold CR. *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? J Clin Microbiol. 2016; 54: 524-528.
10. Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. Genome Biol. 2011; 12: R29.
11. Wu Z, Mirza H, Tan KSW. Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8: e2885.
12. Ajjampur SSR, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KSW. Ex vivo and in vivo mice models to study *Blastocystis* spp. adhesion, colonization and pathology: closer to proving Koch's postulates. PLoS One. 2016; 11: e0160458.
13. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. PLoS Pathog. 2012; 8: e1002545.
14. Audebert C, Even G, Cian A, The *Blastocystis* Investigation Group, Loywick A, Merlin S, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. Sci Rep. 2016; 6: 25255.
15. Lepczynska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticarial caused by *Blastocystis* spp.? Int J Dermatol. 2016; 55: 259-266.
16. Boreham PFL, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. Adv Parasitol. 1993; 32: 1-70.
17. Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev. 1996; 9: 563-584.
18. Yoshikawa H. Epidemiology, transmission, and zoonotic potential of *Blastocystis* in human and animals. In Melhorn H, Tan KSW, Yoshikawa H, editors. *Blastocystis: pathogen or passenger?* Heidelberg: Springer. 2012. pp. 37-49.



## RESULTATS

19. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacon AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo Animals. *Protist*. 2013; 164: 497-509.
20. Yoshikawa H, Koyama Y, Tsuchiya E, Takami K. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol Int*. 2016; doi: 10.1016/j.parint.2016.04.004.
21. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ESU, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop*. 2013; 126: 11-18.
22. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb V, Delgado-Viscogliosi P, Ho L, et al. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 348-355.
23. Parkar U, Traub RJ, Kumar S, Mungthin M, Vitali S, Leelayoova S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology*. 2007; 134: 359-367.
24. Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol*. 2009; 39: 473-479.
25. Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol*. 2010; 169: 8-17.
26. Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res*. 2011; 109: 205-212.
27. Yoshikawa H, Wu Z, Pandey K, Pandey BD, Sherchand JB, Yanagi T, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol*. 2009; 160: 295–300.
28. Lee LL, Chye TT, Karmacharya BM, Govind SK. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organisms, a possibility? *Parasit Vectors*. 2012; 5: 130.
29. Nagel R, Cuttall L, Stensvold CR, Mills PC, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ. *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets to response to therapy. *Intern Med J*. 2012; 42: 1187-1195.

## RESULTATS

30. Wang W, Owen H, Traub RJ, Cuttell L, Inpankaew T, Bielefeldt-Ohmann H. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet Parasitol.* 2014; 203: 264-269.
31. Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, et al. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int.* 2007; 56: 107-112.
32. Alfellani MA, Jacob AS, Perea NO, Krecek RC, Taner-Mulla D, Verweij JJ, et al. Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology.* 2013; 140: 966-971.
33. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet Parasitol.* 2013; 196: 85-89.
34. Petrasova J, Uzlikova M, Kostka M, Petrzekova KJ, Huffman MA, Modry D. Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *Int J Parasitol.* 2011; 41: 1113-1120.
35. Navarro C, Dominguez-Marquez MV, Garijo-Toledo MM, Vega-Garcia S, Fernandez-Barredo S, Perez-Garcia MT, et al. High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems : frequency of ribotypes and associated risk factors. *Vet Parasitol.* 2008; 153: 347-358.
36. Fayer R, Santin M, Macarisin D. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res.* 2012; 111: 1349-1355.
37. Osman M, Bories J, El Safadi D, Poirel M-T, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, et al. Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol.* 2015; 214: 167-170.
38. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 975-983.
39. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993; 10: 512-526.

## RESULTATS

40. Lim YAL, Ngui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR. Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet Parasitol.* 2008; 157: 154-159.
41. Groves CP. Order Primates. In Wilson DE, Reeder DM, editors. *Mammal species of the world: third edition.* Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2005. pp. 111–184.
42. Hamad I, Keita MB, Peeters M, Delaporte E, Raoult D, Bittar F. Pathogenic eukaryotes in gut microbiota of western lowland gorillas as revealed by molecular survey. *Sci Rep.* 2014; 4: 6417.
43. Zanzani SA, Gazzonis AL, Epis S, Manfredi MT. Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitol Res.* 2016; 115: 307-312.
44. Helenbrook WD, Shields WM, Whipps CM. Characterization of *Blastocystis* species infection in humans and mantled howler monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*, living in close proximity to one another. *Parasitol Res.* 2015; 114: 2517-2525.
45. Kalousova B, Piel AK, Pomajbikova K, Modry D, Stewart FA, Petrzalkova KJ. Gastrointestinal parasites of savanna chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Uganda, Tanzania. *Int J Primatol.* 2014; 35: 463-475.
46. Sa RM, Petrasova J, Pomajbikova K, Profousova I, Petrzalkova KJ, Sousa C, et al. Gastrointestinal symbionts of chimpanzees in Cantanhez National Park, Guinea-Bissau with respect to habitat fragmentation. *Am J Prim.* 2013; 75: 1032-1041.
47. Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol.* 2002; 106: 203-212.
48. Spanakos G, Papadogiannakis E, Kontos V, Menounos P, Velonakis E, Koutis C, et al. Molecular screening for *Blastocystis* sp. in canine faecal samples in Greece. *J Hell Vet Med Soc.* 2011; 62: 216-220.
49. Boarato David E, Guimaraes S, de Oliveira AP, Goulart de Oliveira-Sequeira TC, Nogueira Bittencourt G, Moraes Nardi AR, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the state of Sao Paulo, Brazil. *Parasites Vect.* 2015; 8: 103.
50. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Naaglor T, Taamasri P, Mungthin M. Prevalence of intestinal parasitic infections in Military personnel and military dogs, Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2009; 92: S53-S59.

## RESULTATS

51. Wang W, Cuttell L, Bielefeldt-Ohmann H, Inpankaew T, Owen H, Traub RJ. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasites Vect.* 2013; 6: 215.
52. Ruaux CG, Stang BV. Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS ONE.* 2014; 9: e107496.
53. La Sala LF, Leiboff A, Burgos JM, Costamagna SR. Spatial distribution of canine zoonotic enteroparasites in Bahia Blanca, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2015; 47: 17-24.
54. Belleza MLB, Reyes JCB, Tongol-Rivera PN, Rivera WL. Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitol Int.* 2016; 65: 291-294.
55. Tan TC, Tan PC, Sharma R, Sugnaseelan S, Suresh KG. Genetic diversity of caprine *Blastocystis* from Peninsular Malaysia. *Parasitol Res.* 2013; 112: 85-89.
56. Badparva E, Sadraee J, Kheirandish F. Genetic diversity of *Blastocystis* isolated from cattle in Khorramabad, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8: e14810.
57. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, Arayama S, Asih PBS, Rozi IE, et al. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int.* 2016; doi: 10.1016/j.parint.2016.03.010.
58. Yamada M, Yoshikawa H, Tegoshi T, Matsumoto Y, Yoshikawa T, Shiota T, Yoshida Y. Light microscopical study of *Blastocystis* spp. in monkeys and fowls. *Parasitol Res.* 1987; 73: 527-531.
59. Stenzel DJ, Cassidy MF, Boreham PFL. Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitol Res.* 1994; 80: 131-137.
60. Lee MG, Stenzel DJ. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitol Res.* 1999; 85: 109-117.
61. Bergamo do Bomfilm TC, Machado do Couto MC. Morphological diagnosis and occurrence of *Blastocystis* spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. *J Parasitol Vector Biol.* 2013; 5: 20-26.
62. Ponce Gordo F, Herrera S, Castro AT, Garcia Duran B, Martinez Diaz RA. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea Americana*) in Europe. *Vet Parasitol.* 2002; 107: 137-160.

## RESULTATS

63. Chandrasekaran H, Govind SK, Panchadcharam C, Bathmanaban P, Raman K, Thergarajan G. High lipid storage in vacuolar forms of subtype 6 *Blastocystis* sp. in ostrich. *Parasites Vect.* 2014; 7: 469.
64. Teow WL, Ng GC, Chan PP, Chan YC, Yap EH, Zaman V, Singh M. A survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitol Res.* 1992; 78: 453-455.
65. Suresh K, Mak JW, Chuong LS, Rangunathan T. Sac-like pouches in *Blastocystis* from the house lizard *Cosymbotus platyurus*. *Parasitol Res.* 1997; 83: 523-525.
66. Singh M, Ho LC, Yap ALL, Ng GC, Tan SW, Moe KT, Yap EH. Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitol Res.* 1996; 82: 165-169.
67. Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, Singh M, Hashimoto T. Problems in speciation in the genus *Blastocystis*. *Trends Parasitol.* 2004; 20: 251-255.
68. Kostka M, Uzlikova M, Cepicka I, Flegr J. SlowFaster, a user-friendly program for slow-fast analysis and its application on phylogeny of *Blastocystis*. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9: 341.
69. Zaman V, Ng GC, Suresh K, Yap EH, Singh M. Isolation of *Blastocystis* from the cockroach (Dictyoptera: Blattidae). *Parasitol Res.* 1993; 79: 73-74.
70. Valencakova A, Kandrakova P, Kalinova J, Danisova O, Hasajova A. Detection of *Blastocystis hominis* subtype 3 in the brown bear in the Slovak Republic. *Folia Vet.* 2014; 58: 175-178.
71. Fayer R, Elsasser T, Gould R, Solano G, Urban J, Santin M. *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitol Res.* 2014; 113: 1465-1472.
72. Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo NG, Tan KSW. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *J Eukaryot Microbiol.* 2007; 54: 33-37.
73. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist.* 2006; 157: 77-85.
74. Eroglu F, Koltas IS. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitol Res.* 2010; 107: 841-845.
75. König G, Müller HE. *Blastocystis hominis* in animals: incidence of four serogroups. *Zbl Bakt.* 1997; 286: 435-440.
76. Perez-Cordon G, Rosales MJ, Gavira MM, Valdez RA, Vargas F, Cordova O. Finding of *Blastocystis* sp. in bivalves of the genus *Donax*. *Rev Peru Biol.* 2007; 14: 301-302.

# RESULTATS

## Supporting information

**S1 Table.** Isolation source (center), season of collect, ST identification and GenBank accession number of *Blastocystis* spp. isolates characterized in our study.

Isolate	Zoo <sup>a</sup>	Animal host	<i>Blastocystis</i> sp. ST	GenBank accession number
LPP1	LP	<i>Gorilla gorilla</i>	ST2	KR259402
LPP2	LP	<i>Gorilla gorilla</i>	ST1	KR259403
LPP3	LP	<i>Gorilla gorilla</i>	ST5	KR259404
LPP4	LP	<i>Gorilla gorilla</i>	ST5	KR259405
LPP7	LP	<i>Pongo pygmaeus</i>	ST5	KR259406
LPP8	LP	<i>Pongo pygmaeus</i>	ST5	KR259407
LPP9	LP	<i>Pongo pygmaeus</i>	ST5	KR259408
LPP10	LP	<i>Pan troglodytes</i>	ST2	KR259409
LPP23	LP	<i>Pan troglodytes</i>	ST5	KR259410
LPP16	LP	<i>Nomascus gabriellae</i>	ST1	KR259411
LPP17	LP	<i>Nomascus gabriellae</i>	ST1	KR259412
LPP13 clone 1	LP	<i>Macaca nemestrina</i>	ST3	KR259413
LPP13 clone 2	LP	<i>Macaca nemestrina</i>	ST1	KR259414
LPP14	LP	<i>Macaca nemestrina</i>	ST1	KR259415
LPP15	LP	<i>Macaca nemestrina</i>	ST1	KR259416
LPP18	LP	<i>Mandrillus sphinx</i>	ST1	KR259417
LPP56	LP	<i>Cercopithecus hamlyni</i>	ST1	KR259418
LPP31	LP	<i>Cercopithecus roloway</i>	ST2	KR259419
LPP35	LP	<i>Cercopithecus lhoesti</i>	ST3	KR259420
LPP36 clone 1	LP	<i>Cercopithecus neglectus</i>	ST3	KR259421
LPP36 clone 2	LP	<i>Cercopithecus neglectus</i>	ST1	KR259422
LPP37	LP	<i>Cercopithecus neglectus</i>	ST3	KR259423
LPP54	LP	<i>Colobus guereza</i>	ST2	KR259424
LPP55	LP	<i>Colobus guereza</i>	ST1	KR259425
LPP39	LP	<i>Saguinus imperator</i>	ST3	KR259426
LPP42	LP	<i>Leonpithecus chrysomelas</i>	ST1	KR259427
LPP43	LP	<i>Leonpithecus chrysomelas</i>	ST1	KR259428
LPP44	LP	<i>Leonpithecus chrysomelas</i>	ST1	KR259429
LPP21	LP	<i>Lemur catta</i>	ST2	KR259430
LPP22	LP	<i>Lemur catta</i>	ST2	KR259431
LPP26	LP	<i>Lemur catta</i>	ST2	KR259432
LPP45	LP	<i>Lemur catta</i>	ST1	KR259433
LPP19 clone 1	LP	<i>Varecia rubra</i>	ST4	KR259434
LPP19 clone 2	LP	<i>Varecia rubra</i>	ST8	KR259435
LPP19 clone 3	LP	<i>Varecia rubra</i>	ST1	KR259436
LPP24	LP	<i>Varecia rubra</i>	ST5	KR259437
LPP25	LP	<i>Varecia variegata</i>	ST4	KR259438
LPP52	LP	<i>Eulemur flavifrons</i>	ST4	KR259439
LPC7	LP	<i>Acinonyx jubatus</i>	ST2	KR259440
LPC11	LP	<i>Canis lupus</i>	ST3	KR259441
LPC3	LP	<i>Ursus maritimus</i>	ST3	KR259442
LPC41	LP	<i>Zalophus californianus</i>	ST1	KR259443
LPM9 clone 1	LP	<i>Giraffa camelopardalis</i>	ST14	KR259444
LPM9 clone 2	LP	<i>Giraffa camelopardalis</i>	ST10	KR259445
LPM10	LP	<i>Giraffa camelopardalis</i>	ST14	KR259446
LPM11	LP	<i>Giraffa camelopardalis</i>	ST14	KR259447
LPM13	LP	<i>Giraffa camelopardalis</i>	ST14	KR259448
LPM20	LP	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	ST10	KR259449

# RESULTATS

LPM21	LP	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	ST10	KR259450
LPM22	LP	<i>Tragelaphus eurycerus</i>	ST10	KR259451
LPM44 clone 1	LP	<i>Bison bison</i>	ST14	KR259452
LPM44 clone 2	LP	<i>Bison bison</i>	ST10	KR259453
LPM23	LP	<i>Connochaetes taurinus</i>	ST14	KR259454
LPM33	LP	<i>Oryx beisa</i>	ST10	KR259455
LPM34	LP	<i>Oryx beisa</i>	ST10	KR259456
LPM35	LP	<i>Oryx beisa</i>	ST10	KR259457
LPM36	LP	<i>Oryx dammah</i>	ST10	KR259458
LPM37	LP	<i>Oryx dammah</i>	ST10	KR259459
LPM38	LP	<i>Oryx dammah</i>	ST10	KR259460
LPM39	LP	<i>Oryx dammah</i>	ST10	KR259461
LPM40	LP	<i>Oryx dammah</i>	ST3	KR259462
LPM8 clone 1	LP	<i>Capra hircus</i>	ST10	KR259463
LPM8 clone 2	LP	<i>Capra hircus</i>	ST14	KR259464
LPM25	LP	<i>Equus burchellii</i>	ST3	KR259465
LPM29	LP	<i>Equus asinus</i>	ST3	KR259466
LPM30 clone 1	LP	<i>Equus asinus</i>	ST2	KR259467
LPM30 clone 2	LP	<i>Equus asinus</i>	ST3	KR259468
LPM31	LP	<i>Tapirus terrestris</i>	ST3	KR259469
LPM32	LP	<i>Tapirus terrestris</i>	ST3	KR259470
LPA4	LP	<i>Elephas maximus</i>	ST1	KR259471
LPA5 clone 1	LP	<i>Elephas maximus</i>	ST3	KR259472
LPA5 clone 2	LP	<i>Elephas maximus</i>	ST1	KR259473
LPA6 clone 1	LP	<i>Elephas maximus</i>	ST1	KR259474
LPA6 clone 2	LP	<i>Elephas maximus</i>	ST3	KR259475
LPA8	LP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	ST2	KR259476
LPA10	LP	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	NMAST <sup>b</sup>	KR259477
LPA1-1	LP	<i>Pteropus rodricensis</i>	ST3	KR259478
LPA1-2	LP	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	ST3	KR259479
LPA3	LP	<i>Macropus rufogriseus</i>	NMAST	KR259480
LPO12	LP	<i>Pavo cristatus</i>	NMAST	KR259481
LPO19	LP	<i>Phoenicopterus ruber</i>	ST1	KR259482
LPO35	LP	<i>Struthio camelus</i>	ST5	KR259483
LPO36	LP	<i>Struthio camelus</i>	ST5	KR259484
LPO38	LP	<i>Rhea americana</i>	ST4	KR259485
LPO39 clone 1	LP	<i>Rhea americana</i>	ST5	KR259486
LPO39 clone 2	LP	<i>Rhea americana</i>	ST4	KR259487
ZLA1	ZL	<i>Varecia rubra</i>	ST7	KR259488
ZLA2	ZL	<i>Varecia variegata</i>	ST7	KR259489
ZLA3	ZL	<i>Lemur catta</i>	ST8	KR259490
ZLA15	ZL	<i>Pithecia pithecia</i>	ST2	KR259491
ZLA19	ZL	<i>Rattus norvegicus</i>	ST4	KR259492
ZLA31	ZL	<i>Blaberus giganteus</i>	ST2	KR259493
ZLA33-3	ZL	<i>Blaptica dubia</i>	ST3	KR259494
ZLA35-2	ZL	<i>Schistocerca gregaria</i>	ST2	KR259495
ZLB5	ZL	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	ST5	KR259496
ZLB6	ZL	<i>Vicugna pacos</i>	ST10	KR259497
ZLB10	ZL	<i>Equus burchellii</i>	NMAST	KR259498
ZLB12	ZL	<i>Taurotragus oryx</i>	ST14	KR259499
ZLB15	ZL	<i>Symphalangus syndactylus</i>	ST3	KR259500
ZLB16	ZL	<i>Symphalangus syndactylus</i>	ST4	KR259501
ZLB17	ZL	<i>Symphalangus syndactylus</i>	ST3	KR259502
ZLB18	ZL	<i>Symphalangus syndactylus</i>	ST3	KR259503
ZLB22	ZL	<i>Tapirus terrestris</i>	ST5	KR259504
ZLB25	ZL	<i>Hylobates lar</i>	ST15	KR259505
ZLB26	ZL	<i>Hylobates lar</i>	ST2	KR259506
ZLB27	ZL	<i>Aldabrachelys gigantea</i>	NMAST	KR259507

## RESULTATS

ZLB30	ZL	<i>Iguana iguana</i>	NMAST	KR259508
ZLB37	ZL	<i>Tragulus javanicus</i>	ST13	KR259509
ZLC1 clone 1	ZL	<i>Testudo graeca</i>	NMAST	KR259510
ZLC1 clone 2	ZL	<i>Testudo graeca</i>	NMAST	KR259511
ZLC7	ZL	<i>Boa constrictor</i>	NMAST	KR259512

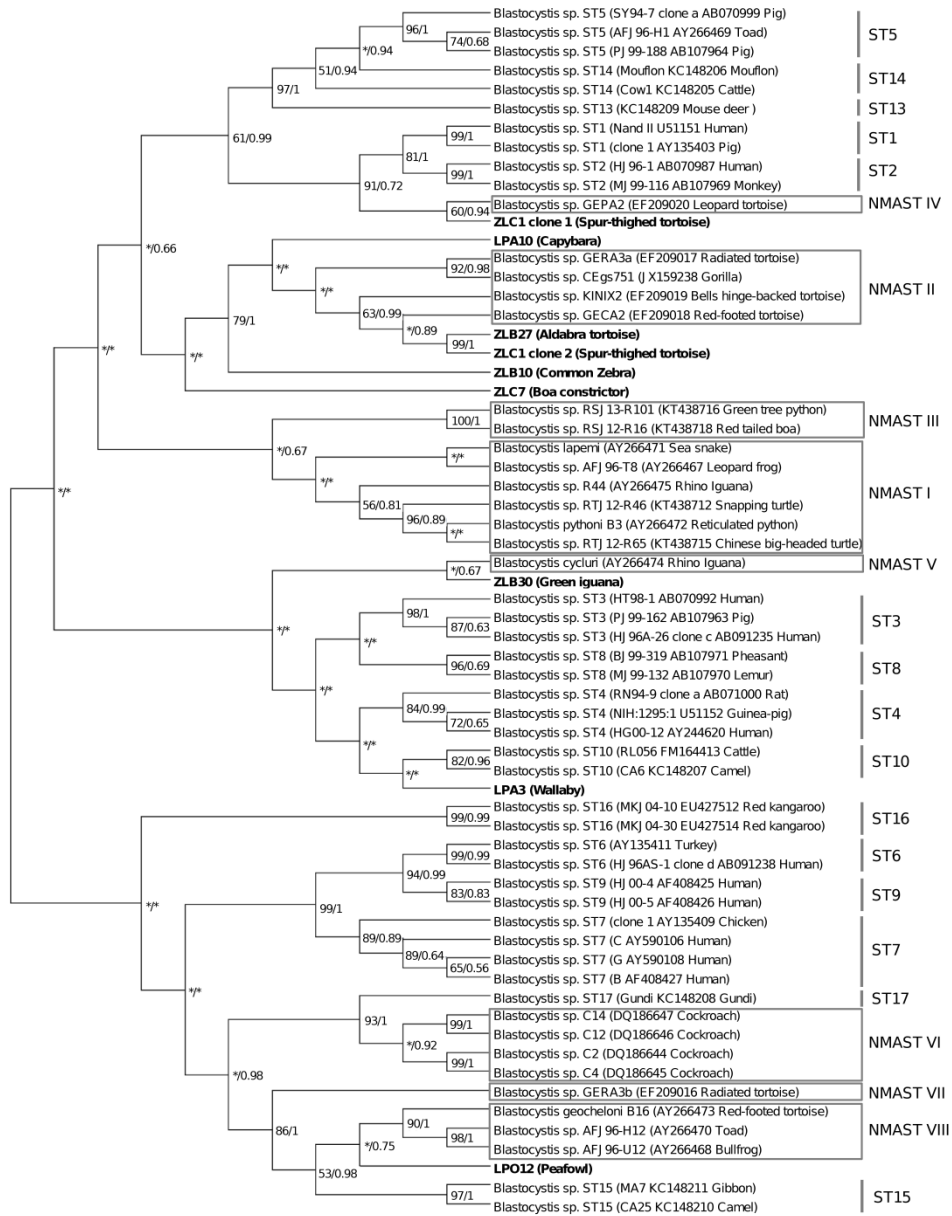
<sup>a</sup> ZL : Zoo of Lille ; LP : Zoo of La Palmyre

<sup>b</sup> NMAST: Non Mammalian and Avian ST



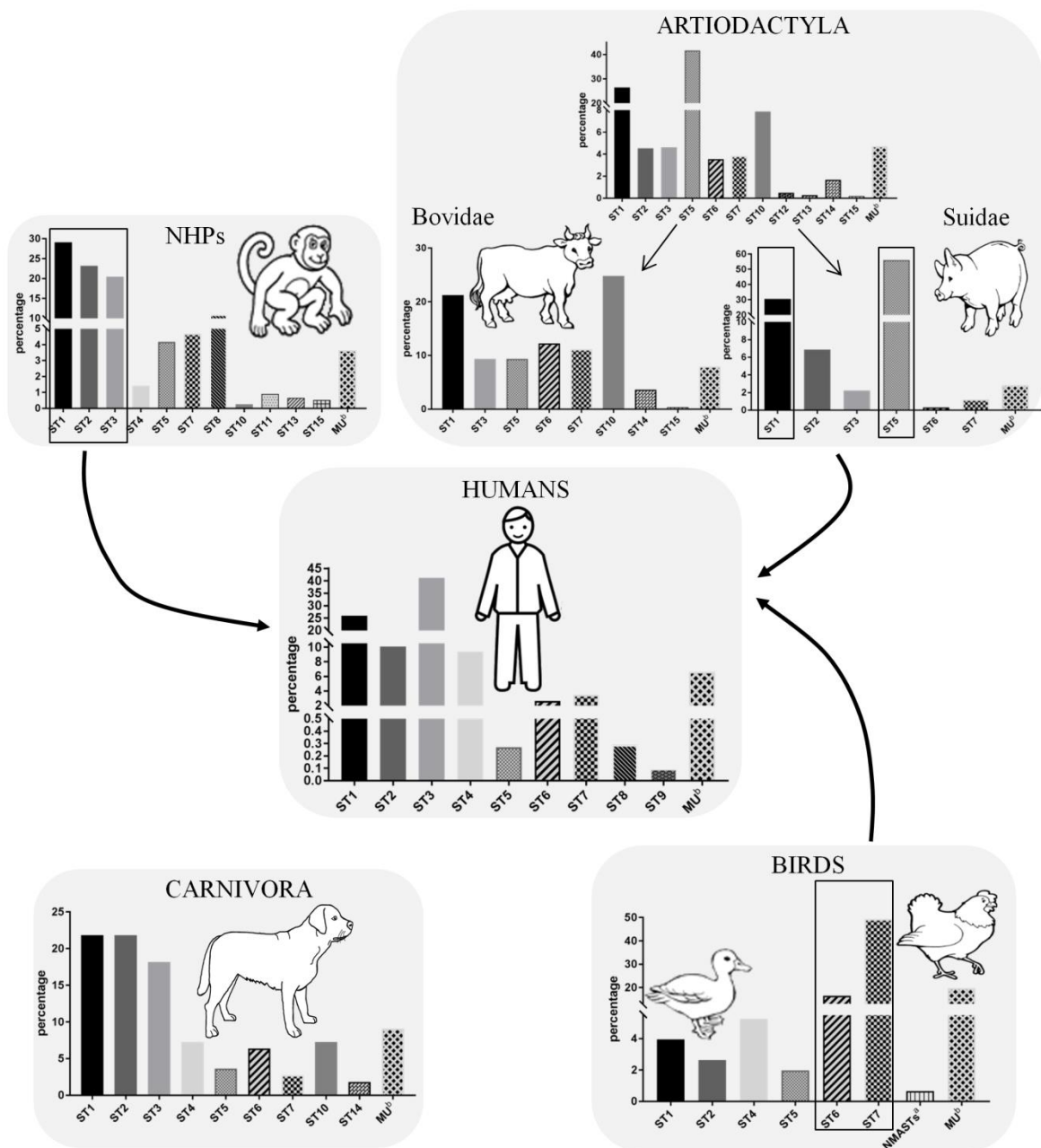
# RESULTATS

**Fig 1. Unrooted maximum likelihood tree based on SSU rDNA gene sequences depicting relationships between *Blastocystis* spp. isolates.** The numbers at the node indicate BPs and BPPs respectively, given by ML and Bayesian analyses with 1,000 replicates. The asterisks designate nodes with BPs or BPPs below 50% or 0.5. The sequences obtained in this study are shown in bold.



# RESULTATS

**Figure 2. Comparison of the distribution and relative prevalence of *Blastocystis* spp. STs in humans and major animal groups and evaluation of potential zoonotic risk.** Histograms showing the prevalence of each ST as a percentage were obtained from the total values summarized in Table 3 for humans and the four most sampled animal groups, including NHPs, artiodactyls, carnivores, and birds. In the case of artiodactyls, the data were presented globally for this animal group, but also separately for Bovidae and Suidae. The arrows indicate possible zoonotic transmission by various boxed *Blastocystis* spp. STs predominant in these animal groups. NMAST = Non Mammalian and Avian ST; MU = Mixed ST / untypable.



## 3. Physiopathologie de *Blastocystis* sp. et facteurs de virulence

### I. Cas clinique d'appendicite liée à une colonisation par *Blastocystis* sp.

*Préambule* : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal «*Emerging Infectious Diseases*».

#### a. Introduction

Comme nous l'avons détaillé en particulier dans l'**Article 1** puis comme cela a été repris par la suite dans la revue d'Ajjampur et Tan (2016), des avancées significatives ont été réalisées concernant la physiopathologie de *Blastocystis* sp. Cependant, le lien entre pathologies intestinales et infection par ce parasite reste encore à clarifier tout comme d'ailleurs son caractère invasif. Cette clarification passe entre autres par l'étude de cas cliniques comme celui décrit ici chez une enfant de 9 ans en vacances au Maroc et qui se présenta à son retour en France au CHRU de Lille avec une appendicite purulente et une péritonite associée à une blastocystose.

#### b. Résultats

Fréalte E.\*, El Safadi D.\*, **Cian A.**, Aubry E., Certad G., Osman M., Wacrenier A., Dutoit E., Creusy C., Dubos F., Viscogliosi E. 2014. Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco. *Emerg Infect Dis* 21(1):91-94

\* **Co-premiers auteurs**

#### c. Conclusion

L'analyse moléculaire réalisée à partir des selles, du liquide péritonéal, de la poche de Douglas et de l'appendice de cette patiente a révélé sans ambiguïté la présence de *Blastocystis* sp. dans chacun de ces prélèvements. Aucun autre agent infectieux n'a été identifié dans ces mêmes échantillons. De plus, des observations histologiques et immunohistochimiques ont permis de mettre en évidence *Blastocystis* sp. dans la lumière et dans le chorion de l'appendice confirmant ainsi son potentiel invasif et inflammatoire même si le parasite n'est sûrement pas la cause majeure de l'appendicite (obstruction mécanique probable). L'administration à cette patiente d'un traitement à base de tinidazole (antibiotique dérivé du métronidazole) a résolu ses symptômes gastro-intestinaux et le parasite n'a plus été identifié

## RESULTATS



dans ses selles. Dans le cadre de cette étude, des diarrhées parfois sévères ainsi que des vomissements ont aussi été observés chez 26 autres membres de la famille de la patiente tous réunis pour une fête familiale. Même si *Blastocystis* sp. n'a malheureusement pas pu être identifié chez ces autres membres de la famille qui habitent au Maroc, ces observations suggérèrent fortement une épidémie de blastocystose d'origine hydrique.

### **Ma contribution dans cette étude :**

- ✓ Gestion des échantillons
- ✓ Enregistrement des données
- ✓ Participation aux analyses histologiques et immunohistochimiques
- ✓ Lecture et correction du manuscrit

# RESULTATS

## **Article 7: Acute *Blastocystis*-associated appendicular peritonitis in a child, Casablanca, Morocco**

**Emilie Fréalle\*, Dima El Safadi\*, Amandine Cian, Estelle Aubry, Gabriela Certad, Marwan Osman, Agnès Wacrenier, Emmanuel Dutoit, Colette Creusy, François Dubos, Eric Viscogliosi.**

\* These authors contributed equally to this article

**Author affiliations:** Lille University Hospital Center & Faculty of Medicine of Lille, Univ. Lille Nord de France, France (E. Fréalle, E. Aubry, A. Wacrenier, E. Dutoit, F. Dubos); Pasteur Institute of Lille, Center of Infection and Immunity of Lille (CIIL), INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ. Lille Nord de France, France (E. Fréalle, D. El Safadi, A. Cian, G. Certad, M. Osman, E. Viscogliosi); AZM Centre for Research in Biotechnology and its Application, Doctoral School, Lebanese University, Tripoli, Lebanon (D. El Safadi, M. Osman); Hospital Group of the Catholic Institute of Lille (GHICL), France (C. Creusy).

**Running title (45 characters):** *Blastocystis* appendicitis in Casablanca (Morocco)

**Address for correspondence:** Dr Emilie Fréalle, Pasteur Institute of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University Lille-Nord de France, Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, 1 rue du Pr Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France; Tel: +33 3 20 87 71 56, Fax: +33 3 20 87 78 88; email: emilie.frealle@pasteur-lille.fr

### **Abstract (50 words)**

Despite increasing reports of *Blastocystis* association with digestive symptoms, its pathogenicity remains controversial. We report a case of appendicular peritonitis in a 9-year-old girl returning from Morocco. Only *Blastocystis* was detected in stools, appendix, peritoneal liquid, and Douglas pouch. Simultaneous gastroenteritis in 26 members of the child's family suggested outbreak.

### **Text (1 195 words)**

*Blastocystis* is a ubiquitous anaerobic protozoan parasite infecting humans and a vast range of animal species. Prevalence in humans varies from 0.5-24% in developed countries to 30-76% in developing countries (1, 2). Classical clinical features include gastro-intestinal symptoms such as nausea, anorexia, flatulence, acute or chronic diarrhea. Fever is usually absent. An association with irritable bowel syndrome and extra-intestinal manifestations such as urticaria

## RESULTATS

has been suggested (2). Reports about invasive infection or disseminated diseases are rare (3). Here, we report the case of a pediatric patient infected with *Blastocystis* who presented with gastroenteritis associated with suppurative appendicitis and peritonitis.

In August 2013, a 9-year-old girl returning from a 1-month stay with her family in Casablanca, Morocco, was admitted to Lille University Hospital. Symptoms started in Casablanca 3 days before hospital admission and included fever, severe diarrhea (>10 stools/day), vomiting, abdominal pain in the hypogastric area and in the right and left lower quadrants associated with bilateral dorsal pain, anorexia and weakness. Blood count showed 13,850/mm<sup>3</sup> white blood cells (75.4% neutrophils, 15.9% lymphocytes and 8.5% monocytes). C-Reactive Protein was increased at 266 mg/l. A traveler's gastroenteritis was diagnosed and a symptomatic treatment with paracetamol, phloroglucinol and racecadotril was prescribed. However, increase in abdominal pain and total food intolerance occurred in the following hours. An abdominal echography was performed, revealing appendicitis with suppuration in the Douglas Pouch and the reflex ileus. Parasitological examination of stools revealed only abundant *Blastocystis* vacuolar forms, with more than 5 parasites per field. Absence of *Cryptosporidium* was further confirmed by glycerin method and real-time PCR. Yeasts and a multi-microbial flora were present in the stools but other infectious agents such as *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus and Rotavirus were not detected. Similarly, multi-microbial flora but no pathogenic bacteria were detected in the peritoneal liquid and Douglas Pouch (Table 1). Histopathological observation revealed acute suppurative appendicitis with ulcerations extending deep into muscularis, covered with a suppurative and fibrinous exudate. An infiltration by numerous neutrophils, eosinophils plasma cells and lymphocytes was observed through all layers and into the serosa (Fig.1A). After hematoxylin-eosin staining and immunofluorescence labeling using the anti-*Blastocystis* Paraflor B monoclonal antibody (Boulder Diagnostics), parasitic forms were detected both in the lumen and in the lamina propria of the mucosa (Fig. 1B-C). Real-time PCR for *Blastocystis* detection was performed as previously described (4) using DNA extracted from stools, appendix, peritoneal liquid and Douglas Pouch, which were all positive. Small Subunit rDNA amplification followed by cloning of the PCR product and sequencing of 5 clones was subsequently performed from all the DNA samples in order to subtype (ST) *Blastocystis* isolates and detect mixed infections (5). ST3 was identified in all the analyzed compartments. Mixed infection with ST2 and ST3 was only detected in the stools. The SSU rDNA gene sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession nos. KJ605630 to KJ605649. The child completely recovered after appendectomy, removal of a

## RESULTATS

stercolith from the appendix lumen, and treatment with tinidazole 20 mg/kg/d and ceftriaxone 50 mg/kg/d for 10 days, together with gentamicin 5 mg/kg/d for 5 days. Although tinidazole is not the first line drug for *Blastocystis* treatment, it was associated with complete recovery and total clearance of parasites from the stools at day 40 (negative detection of *Blastocystis* by light microscopy and real-time PCR). Data obtained from mother's child revealed simultaneous cases of gastroenteritis in 26 family members: 13 adults, ages between 34 and 98-year-old, and 13 children between 18-month-old and 15-year-old, residing in the same building at the residential "Mohammadi" area of Casablanca. Adults presented mild or moderate diarrhea but symptoms were more severe in children who all suffered abundant diarrhea, vomiting and weight loss. Repatriation in France of an 18-month-old baby was considered but his condition finally improved. Finally, none of the family members required hospitalization. No microbiological explorations were performed, and these data could not be objectivized.

### Conclusions

Reports of *Blastocystis* association with diarrhea and clinical symptoms in both immunocompetent and immunocompromised patients have increased in the last two decades. Tissue invasion of *Blastocystis* in the appendix (6) or in the colon mucosa (3), associated with acute or chronic inflammation, has been reported previously. However, there is still a controversy over whether this parasite is commensal or pathogenic. The current case further supports the invasive and inflammatory potential of this parasite. Previous reports regarding the presence of *Blastocystis* in 4 out of 100 appendix specimens from patients with acute appendicitis (7), and of pseudo-appendicular illness, which led to an appendectomy in children with intestinal infection caused by this parasite (8), suggest that *Blastocystis* infection could be associated with appendicitis. Nevertheless, the actual role of *Blastocystis* in the pathogenesis of appendicitis remains controversial. In this report, the presence of a stercolith, which can be found in 50-80% of appendicitis cases, suggested mechanical obstruction of the appendix's lumen, which is the main aetiology of appendicitis. Furthermore, we report dissemination of *Blastocystis* into the lumen, the mucosa, and the Douglas Pouch exudate, associated with appendicular acute inflammation, while no other infectious agents were detected. These observations together with the well-documented acute or chronic inflammation occurring in human or animal *Blastocystis* infections (3,9), likely support the contribution of this infection to the inflammatory process. Infection with ST3 further reinforced this hypothesis. Indeed, the presence of pathogenic strains among ST3 has

## RESULTATS

been confirmed by experimental infections in rats (9). Additionally, a substantial inflammatory reaction and an increased propagation of human colorectal cancer cells exposed to *Blastocystis* ST3 antigens has been demonstrated *in vitro* (10). In humans, the pathogenicity of different STs is unclear and remains as a controversial issue. ST1 isolates were found to be more prevalent among symptomatic patients in Lebanon (5) but ST3 was found to be the only ST revealing pathogenic potential in Malaysian patients when compared to ST1 and ST2 (11). ST3 was also found to be more significantly associated with diarrhea in Libya (12). In the current case, the fact that only ST3 was detected in all analyzed compartments, whereas a mixed infection with ST2 and ST3 was found in the child's stools further supports the high invasive potential of ST3. Interestingly, ST3 is the most common ST in Europe, but, in African countries, its frequency varies from 17.8% in Libya (12) to 61.9% in Egypt (13). In Morocco, a 28.7% prevalence of blastocystosis has been reported but data concerning the ST distribution of the parasite are not available (14). Furthermore, although *Blastocystis* infection could not be confirmed among the child's relatives, the simultaneous occurrence of gastroenteritis cases in the same family and the absence of other infectious agents in the child's stools suggest a potential *Blastocystis* outbreak. Spreading of *Blastocystis* could have occurred within the child's family, as previously reported in Italy, where two adopted children originating from India and the Ivory Coast transmitted *Blastocystis* to their adoptive parents and grandmother (15). A possible acquisition of this parasite from a common source such as contaminated water could also explain family transmission. Altogether, this data highlights the interest of both systematic parasitological examinations of stools in patients with invasive infections returning from countries with high *Blastocystis* prevalence and routine provision of imidazoles for peritonitis empiric treatment.

### **Acknowledgements**

We thank the members of the team "Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens" of the Pasteur Institute of Lille, especially Sadia Benamrouz and Karine Guyot for their support. This work was supported by grants from the "Programme Orientations Stratégiques" from the University of Lille 2, the "Centre National de la Recherche Scientifique", and the Pasteur Institute of Lille. DES and MO were both supported by PhD fellowships from the "Conseil National de la Recherche Scientifique" and the Azm & Saade Association from Lebanon, and AC by a PhD fellowship from the Pasteur Institute of Lille and the University of Lille 2.



## RESULTATS

Dr Fréalle is a hospital practitioner and researcher in Lille University Hospital Center and Pasteur Institute of Lille. Her primary research interests are respiratory fungal and intestinal parasitic infections, with special emphasis on biodiversity and pathogenesis.

### References

1. Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, Verhaar N, Wassenaar CJA, van Vugt M, Goorhuis A, and van Gool T. Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis* 2013;13:389.
2. Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*--diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 2009;25:23-9.
3. Janarthanan S, Khoury N, Antaki F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy* 2011;43 Suppl 2:E185-6.
4. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 2011;49:975-83.
5. El Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* in Lebanon and correlation between subtype 1 and gastrointestinal symptoms. *Am J Trop Med Hyg* 2013;88:1203-6.
6. Lintong PM, Sambuaga MK, Tambajong EH. Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. *Asian Pac J Trop Dis* 2012;S965-8.
7. Thanikachalam MP, Kasemsuk Y, Mak JW, Sharifah Emilia TS, Kandasamy P. A study of parasitic infections in the luminal contents and tissue sections of appendix specimens. *Trop Biomed* 2008;25:166-72.
8. Fleta Zaragozano J, Clavel Parrilla A, Castillo García FJ, Bueno Lozano M, Sarría Chueca A. *Blastocystis hominis* and abdominal pain in childhood. *An Esp Pediatr* 1993;38:13-6.
9. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* 2008;102:853-60.
10. Kumarasamy V, Kuppusamy UR, Samudi C, Kumar S. *Blastocystis* sp. subtype 3 triggers higher proliferation of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol Res* 2013;112:3551-5.

## RESULTATS

11. Tan TC, Suresh KG, Smith HV. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitol Res* 2008;104:85-93.
12. Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Al-Mekhlafi AM, Ahmed A, Surin J. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. *PloS One* 2013;8:e84372.
13. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res* 2010;106:505-11.
14. El Guamri Y, Belghyti D, Barkia A, Tiabi M, Aujjar N, Achicha A, et al. Parasitic infection of the digestive tract in children in a regional hospital center in Gharb (Kenitra, Morocco): some epidemiological features. *East Afr J Public Health* 2011;8:250-7.
15. Guglielmetti P, Cellesi C, Figura N, Rossolini A. Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. *Lancet* 1989;2:1394.

## RESULTATS

**Table 1.** Time of sampling and results for microbiological examination of stools, appendix, Douglas pouch and peritoneal liquid.

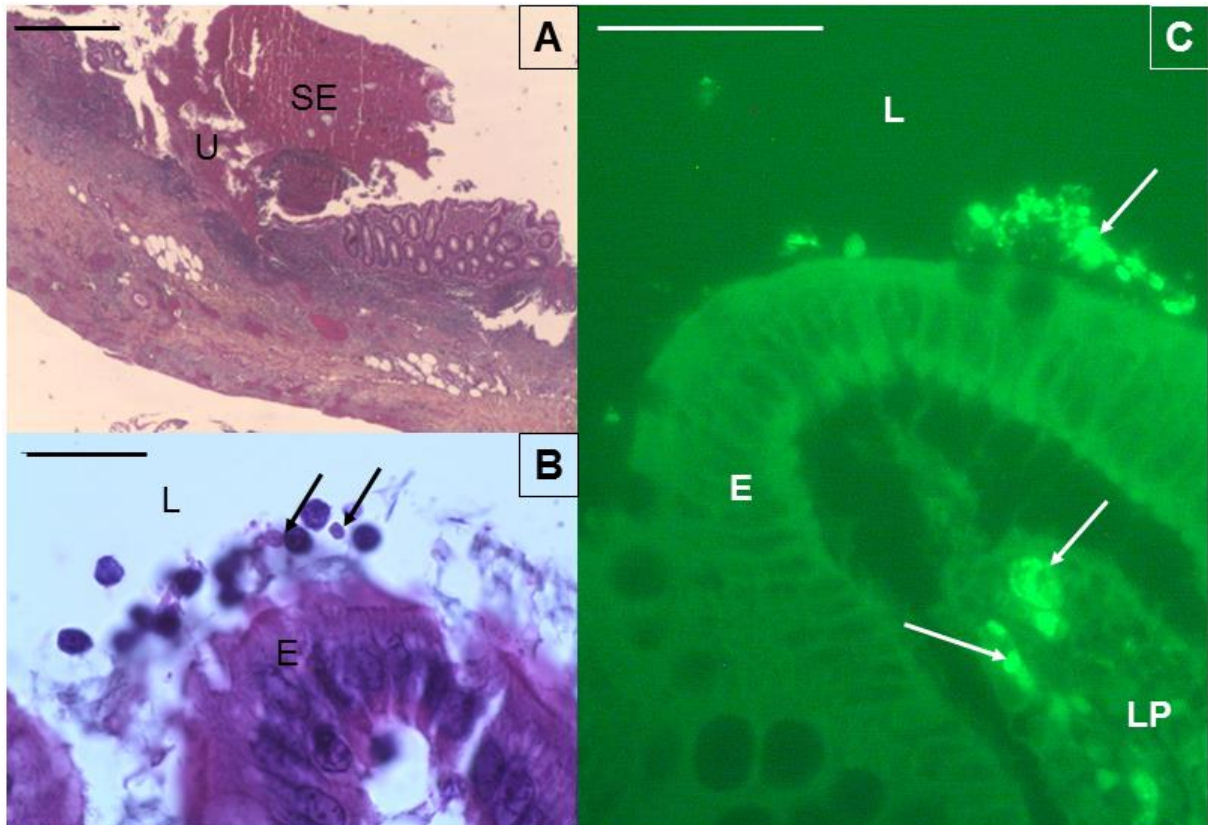
Time of sampling	Samples	Microbiological findings				
		Parasitology			Bacteriology (culture)	Virology (antigen detection)
		Light microscopy	Real-time PCR	<i>Blastocystis</i> subtype		
Aug 30 <sup>th</sup> 2013	<u>Stool</u>	Presence of <i>Blastocystis</i> Absence of <i>Cryptosporidium</i> or other parasites	<i>Blastocystis</i> : positive <i>Cryptosporidium</i> : negative	ST3 & ST2	Absence of <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	Adenovirus and Rotavirus: Negative
Sept 1 <sup>st</sup> 2013	<u>Appendix</u>	Presence of <i>Blastocystis</i>	<i>Blastocystis</i> : positive	ST3	ND	ND
	<u>Douglas pouch</u>	ND*	Positive	ST3	<u>Multimicrobial flora</u>	ND
	<u>Peritoneal liquid</u>	ND	Positive	ST3	<u>Multimicrobial flora</u>	ND
Sept 5 <sup>th</sup> 2013	<u>Stool</u>	Presence of <i>Blastocystis</i>	ND	ND	Absence of <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	Adenovirus and Rotavirus: Negative
Oct 27 <sup>th</sup> 2013	<u>Stool</u>	Negative	Negative	ND	ND	ND

\*ND=Not done

## RESULTATS

### Figure legend

**Figure 1. Histopathological examination of appendix sections.** A. Ulceration (U) covered with suppurative and fibrinous exudates (SE) (hematoxylin-eosin). B. *Blastocystis* (arrow) in the lumen (L), and at the surface of the epithelium (E) (hematoxylin-eosin). C. *Blastocystis* (arrow) in the lumen, at the surface of the epithelium and in the lamina propria (LP) of the mucosa (immunofluorescence labeling with anti-*Blastocystis* ParaFlorB antibody).



# RESULTATS

## II. Microbiote intestinal et colonisation par *Blastocystis* sp.

Préambule : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal «Scientific Reports».

### a. Introduction

A l'exception de l'étude retrospective réalisée par Andersen et al. (2015) qui s'est limitée à analyser l'association entre la prévalence de 3 groupes bactériens du microbiote intestinal (*Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Prevotella*) et le portage de *Blastocystis* sp., aucune donnée n'était disponible concernant les interactions potentielles entre la colonisation par ce parasite et le microbiote intestinal dans sa totalité. Pour répondre à cette interrogation, la composition bactérienne totale du microbiote intestinal a été comparée entre individus infectés par *Blastocystis* sp. et individus non infectés par ce parasite. Pour ce faire, les ADN extraits des selles des patients de l'étude épidémiologique menée en France ont été utilisés dans le cadre d'une approche de métagénomique ciblant une région du gène de l'ADNr 16S. **(Article 8)**.

### b. Résultats

Audebert C., Even G., **Cian A.**, The *Blastocystis* Investigation Group\*, Loywick A., Merlin S., Viscogliosi E., Chabé M.. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep* 5(6): 25255

\* The *Blastocystis* Investigation Group: Dima El Safadi, Gabriela Certad, Laurence Delhaes, Bruno Pereira, Céline Nourrisson, Philippe Poirier, Ivan Wawrzyniak, Frédéric Delbac Christelle Morelle, Patrick Bastien, Laurence Lachaud, Anne-Pauline Bellanger, Françoise Botterel, Ermanno Candolfi, Guillaume Desoubreaux, Florent Morio, Christelle Pomares et Meja Rabodonirina,

### c. Conclusion

L'analyse de la composition du microbiote intestinal des 2 groupes de patients a d'abord permis de montrer que les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Proteobacteria sont les phyla prédominants chez tous les patients qu'ils soient infectés ou non par *Blastocystis* sp. De manière inattendue, la diversité bactérienne du microbiote intestinal était plus importante chez les patients infectés par *Blastocystis* sp. que chez les patients non infectés par le parasite. Au niveau des classes et des ordres, les Clostridia et les Mollicutes étaient plus abondants chez

## RESULTATS



les patients infectés par *Blastocystis* sp. alors que les Bacilli l'étaient chez les patient non infectés. Au niveau des familles, les Ruminococcaceae et Prevotellaceae étaient enrichies chez les patients infectés alors que les Enterobacteriaceae étaient plus abondants chez les patients non infectés. En ce qui concernait les genres, *Faecalibacterium* et *Roseburia* étaient plus abondants chez les patients infectés. Or, ces derniers sont connus pour produire du butyrate, un métabolite impliqué dans le maintien de l'homéostasie du côlon et utilisé comme source d'énergie par les cellules épithéliales du côlon. De plus le butyrate serait capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses colorectales. D'après les résultats obtenus dans cette étude, *Blastocystis* sp. ne semblait donc pas être associé à la dysbiose intestinale généralement observée chez les patients atteints de maladie métaboliques ou infectieuses mais plutôt au microbiote intestinal d'un individu sain.

### **Ma contribution dans cette étude :**

- ✓ Participation à la mise en place de l'étude
- ✓ Gestion et préparation des échantillons
- ✓ Enregistrement des données pour les analyses statistiques
- ✓ Lecture et correction du manuscrit

# RESULTATS

## **Article 8: Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota**

**Christophe Audebert<sup>1,2,+</sup>, Gaël Even<sup>1,2,+</sup>, Amandine Cian<sup>3</sup>, The *Blastocystis* Investigation Group<sup>‡</sup>, Alexandre Loywick<sup>1,2</sup>, Sophie Merlin<sup>1,2</sup>, Eric Viscogliosi<sup>3</sup>, and Magali Chabé<sup>3,\*</sup>**

<sup>1</sup>GENES DIFFUSION, Douai, France

<sup>2</sup>PEGASE-Biosciences, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>3</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU de Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

\*magali.chabe@univ-lille2.fr

<sup>+</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>‡</sup>A full list of The *Blastocystis* Investigation Group members appears at the end of the paper.

### **ABSTRACT**

Alterations in the composition of commensal bacterial populations, a phenomenon known as dysbiosis, are linked to multiple gastrointestinal disorders, such as inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome, or to infections by diverse enteric pathogens. *Blastocystis* is one of the most common single-celled eukaryotes detected in human faecal samples. However, the clinical significance of this widespread colonization remains unclear, and its pathogenic potential is controversial. To address the issue of *Blastocystis* pathogenicity, we investigated the impact of colonization by this protist on the composition of the human gut microbiota. For that purpose, we conducted a cross-sectional study including 48 *Blastocystis*-colonized patients and 48 *Blastocystis*-free subjects and performed an Ion Torrent 16S rDNA gene sequencing to decipher the *Blastocystis*-associated gut microbiota. Here, we report a higher bacterial diversity in faecal microbiota of *Blastocystis* colonized patients, a higher abundance of Clostridia as well as a lower abundance of Enterobacteriaceae. Our results contribute to suggesting that *Blastocystis* colonization is usually associated with a healthy gut microbiota, rather than with gut dysbiosis generally observed in metabolic or infectious inflammatory diseases of the lower gastrointestinal tract.

### **Introduction**

*Blastocystis* organisms are nonflagellated Stramenopiles found in a wide range of non-mammalian and mammalian hosts, including humans<sup>1,2</sup>. These protists are mainly transmitted by the faecal-oral route, and have been reported to be the most common single-celled

## RESULTATS

eukaryotes detected in human faecal samples. Indeed, the prevalence of *Blastocystis* in humans varies from 0.5% to 30% in industrialized countries, and from 30% to 76% in developing countries<sup>2-4</sup>. Recently, a *Blastocystis* prevalence of 100% was found in a Senegalese population of children, which is the highest prevalence ever reported worldwide for this protist<sup>5</sup>.

With respect to its high prevalence in human populations, *Blastocystis* has largely been investigated under conditions in which it was believed to cause disease. However, the question of whether *Blastocystis* is a pathogen or a commensal of the human gut still has no definitive answer.

Prevalence data from different studies have implicated *Blastocystis* in various different intestinal and extraintestinal diseases, including inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome (IBS), and urticaria<sup>1,2,6-9</sup>. Moreover, its pathogenic potential in humans was recently questioned in *in vitro* studies together with *in silico* analysis of *Blastocystis* genomes that allowed the identification of potential virulence factors, such as cysteine proteases, and the proposal of a model for its pathogenesis<sup>8,10-15</sup>.

However, *Blastocystis* could also colonize the healthy human gut for long periods of time without resulting in symptomatic carrier status<sup>16,17</sup>. Some evidence even suggests that *Blastocystis* is a prevalent and diverse component of the microbiota in many individuals, as it has been detected with a high prevalence in healthy people<sup>16-18</sup>. Other studies have also demonstrated that *Blastocystis* was more prevalent in healthy controls compared with patients with ulcerative colitis or IBS<sup>18-20</sup>. Thus, the clinical significance of this common intestinal eukaryote remains unsettled and is likely to be correlated with various factors, including genetic variability and generation times of isolates and different host backgrounds as immune status.

As a complement to *in vitro*, *in vivo* and *in silico* studies, another way to address the issue of *Blastocystis* pathogenicity could be to investigate the effects of colonization by this protist on the composition of the gut microbiota. Indeed, it is now well established that alterations in the composition of commensal bacterial populations (a phenomenon known as 'dysbiosis') are linked to multiple intestinal diseases, such as IBD or IBS<sup>21,22</sup>, two potential *Blastocystis*-associated diseases. Furthermore, diverse enteric pathogens can induce significant perturbations in the microbiota or bloom during dysbiosis<sup>23</sup>. For example, intestinal dysbiosis was highlighted after acute *Toxoplasma gondii* gastrointestinal infection in mice<sup>24</sup>. The presence of gut microbiota is also essential for the pathogenic expression of certain enteric eukaryotes, such as *Entamoeba histolytica* or *Giardia duodenalis*<sup>25-27</sup>. Thus, the question



## RESULTATS

arises of whether *Blastocystis* colonization is associated or not with a particular microbiota or with dysbiosis.

Since 2005, metagenomics supported by high-throughput sequencing (HTS) has unveiled a large part of the human microbiota. However, shotgun metagenomics still remains very expensive, and data analysis remains a challenging issue, due to both the size and complex structure of the data<sup>28</sup>. In parallel, targeted metagenomics, also called metagenetics<sup>29</sup>, focuses only on an informative genomic marker. For example, 16S rDNA metagenetics is commonly used to assess the bacterial microbiota. Thanks to HTS evolution and recent benchtop sequencer releases (Ion Torrent and MiSeq technologies), this culture-free application had become widespread in microbiology studies.

In this study, we investigated the gut microbial composition of *Blastocystis*-colonized patients. For this purpose, we performed a cross-sectional study, including 48 *Blastocystis*-colonized patients and 48 *Blastocystis*-free subjects, and used Ion Torrent 16S rDNA gene sequencing and bioinformatics analyses to profile and compare their gut bacterial communities. A higher bacterial diversity was found in *Blastocystis*-colonized patients compared to that identified in *Blastocystis*-free individuals. Moreover, *Blastocystis*-colonized patients exhibited a higher abundance of Clostridia at the class level, and a higher abundance of Ruminococcaceae and Prevotellaceae at the family level, whereas Enterobacteriaceae were enriched in *Blastocystis*-free patients. Based on these data, we suggest that *Blastocystis* colonization is not associated with the gut dysbiosis generally observed in metabolic or infectious intestinal diseases and commonly associated with inflammation of the lower gastrointestinal tract. Colonization by this protist could instead be associated with a healthy gut microbiota.

### **Results**

#### **Patient sampling**

Our first goal was to select 48 samples positive for the protist and 48 *Blastocystis*-free samples among the available 788 faecal DNA samples, about 18% of which were positive for *Blastocystis*. In order to avoid selection bias in the choice of samples, the strategy described in the Materials and Methods section was followed.

After the odds ratio (OR), relative risks (RR) and logistic regression tests, six variables were found to be associated with the presence of *Blastocystis* in our cohort of patients as follows: hospital location, season of sampling, recent travels, presence of other parasites in faecal samples, fever, and abdominal pain. *Blastocystis* colonization was less frequent in winter than

## RESULTATS

in summer (RR = 0.59 [0.45-0.81] and OR = 0.53 [0.36-0.77]) and higher in Lille than in other hospital locations (p-value < 0.01). *Blastocystis* was also more frequently present in faecal samples of patients having travelled recently (RR = 1.89 [1.36-2.62] and OR = 2.22 [1.46-3.37]) and presenting other faecal parasites (RR = 2.53 [1.81-3.54] and OR = 3.56 [2.11-5.99]). Presence of abdominal pain and fever were also found to be associated with *Blastocystis* colonization with RR scores of 1.52 [1.11-2.08] and 1.76 [1.10-2.81], respectively. These six variables were then used to compute the ranked *Blastocystis* colonization risk scores for each patient (see Supplementary Sheet S1). Therefore, the risk scores were used to select the 24 highest score values and the 24 lowest scores in each population of *Blastocystis*-positive or *Blastocystis*-free patients, thus determining 4 groups of 24 patients. Groups 1 and 2 were composed of *Blastocystis*-colonized patients and groups 3 and 4 included *Blastocystis*-free patients; groups 1 and 3 were linked in terms of low environmental and clinical risk factors, and groups 2 and 4 shared high risk factors (see Supplementary Sheet S2).

### **Ion Torrent Sequencing and preprocessing of reads**

The sequencing run of the 96 samples indexed on an Ion 318™ Chip resulted in approximately 1.1 GB of data with a mode reads of 403 bases. A total of 3,962,103 output sequence reads with an average of 42,603 reads per index and an average length of 272 bases per read were obtained (see Supplementary Table S1).

After the preprocessing workflow consisting of a high-quality filtering approach, the final read number was reduced by 31% (2,742,108 reads) and the median read number per index was 29,419, thus highlighting that this approach yielded high-quality sequence data from 16S rRNA gene amplicons (see Supplementary Table S1).

Independent-sample t-tests were conducted to compare the averages of read length, read number per index from output sequence data, and preprocessed read number per index, in both *Blastocystis*-colonized and *Blastocystis*-free patient samples. There were no significant differences between the two main groups for any variable, indicating that there was no technical bias in sequencing for the two main groups of patients (t-values = 0.49; 1.13; 1.77 and p = 0.62; 0.26; 0.08 for the three variables, respectively).

### ***Blastocystis* colonization is associated with increased 16S rRNA gene sequence diversity of gut microbiota**

Alpha-diversity rarefaction curves obtained by plotting the Chao1, Observed OTUs, Shannon and Simpson diversity indexes against the number of sequences per sample (Fig. 1) showed

## RESULTATS

that the sequencing depth encompassed the full extent of phylotype richness in each of the samples, and a large part of the diversity of the samples was detected.

A Mann-Whitney-Wilcoxon test was performed to compare the estimated richness and diversity indexes between the *Blastocystis*-colonized and not colonized patient samples. A higher bacterial diversity in faecal microbiota of patients colonized with *Blastocystis* was detected. Indeed, Shannon and Simpson diversity indexes demonstrated that the faecal microbiota diversity in colonized patients was significantly higher than that observed in *Blastocystis*-free subjects ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2, Table 1). Likewise, observed OTUs and Chao1 richness indexes in colonized patients were significantly higher than those in *Blastocystis*-free subjects ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1, Fig. 2, Table 1). These four indexes were strongly correlated (data not shown). Collectively, these data point towards a greater microbial diversity in the faecal microbiota of *Blastocystis*-colonized patients.

To explore the differences in the overall microbial community composition across the two main groups of patients, the phylogenetic taxonomic Bray–Curtis dissimilarities were calculated.

When the subjects were classified based on their *Blastocystis* colonization status, the PCoA plots obtained from the beta diversity calculation in QIIME demonstrated a relative clustering of samples, whereby the scores for PC1 and PC3 account for 30% of the variance in the data (Fig. 3). This difference between the bacterial communities was significant, as determined using the ANOSIM nonparametric statistical test analysis of similarity, where  $R = 0.112$  ( $p = 0.001$ ).

### **Bacterial microbiota composition of *Blastocystis*-positive faecal samples**

The composition of bacterial faecal microbiota of *Blastocystis*-colonized and *Blastocystis*-free patients was further examined. Initially, the OTU relative abundances from bacterial taxa in each patient's faecal sample were plotted (see Supplementary Fig. S1). At the phylum level, Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria were the most predominant phyla in all patients' faecal samples (see Supplementary Fig. S1).

The differences in the relative abundances of OTUs in faecal microbiota of colonized and not colonized patients were further explored using the Mann-Whitney-Wilcoxon test at different taxa levels. The taxonomic differences between the two groups were also compared using read counts normalized by DESeq2 (White's nonparametric t-test corrected by Benjamini-Hochberg False Discovery Rate multiple test) in STAMP v 2.0.9<sup>30</sup>.

## RESULTATS

At the class level, three bacterial taxa were present at different levels in colonized patients compared to *Blastocystis*-free subjects ( $p < 0.05$  for both Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test and White's nonparametric t-test (W)). Clostridia had a significantly higher relative abundance in colonized patients' samples compared with the *Blastocystis*-free groups (MWW,  $p = 0.0133$ ; W,  $p = 0.049$ ), while relative abundance of Bacilli was significantly lower in colonized patients than in the *Blastocystis*-free subjects (MWW,  $p = 0.0051$ ; W,  $p = 0.00612$ ) (see Supplementary Fig. S1). Mollicutes were also more abundant in colonized patients ( $p < 0.05$  in both tests).

At the order taxonomic level, a PCA plot (Fig. 4(a)) was produced using the 5 most abundant taxa (normalized counts) (i.e. Clostridiales, Lactobacillales, Bacteroidales, Erysipelotrichales and Burkholderiales). More than 40% of the total variance was explained using the first two principal components. This graphic shows that, on one hand, groups 3 and 4, the two groups constituting the *Blastocystis*-free cluster, had a homogeneous microbiota pattern that is relatively distinct from, on the other hand, groups 1 and 2 that constitute a homogeneous *Blastocystis*-positive cluster. The relative abundance of the 5 predominant bacteria orders for these 4 groups of patients was quite similar, ranging from 68.58 % to 71.12 %, respectively, for groups 4 and 3. Among these 5 orders, only two, Lactobacillales and Clostridiales, could be considered to be statistically differentially abundant between *Blastocystis*-free and *Blastocystis*-positive main groups (Fig. 4(b)). Clostridiales, which represented the major abundant order, were significantly more abundant in colonized patients (MWW,  $p = 0.0133$ ; W,  $p = 0.014$ ), and Lactobacillales were more profuse in *Blastocystis*-free individuals (MWW,  $p = 0.001$ ; W,  $p = 0.020$ ) (see Supplementary Fig. S1, Fig. 4(b)). These results were confirmed by performing a Mann-Whitney-Wilcoxon test analysis on OTU relative abundances in the faecal microbiota of group 1 vs. 3 or group 2 vs. 4 patients ( $p < 0.05$ ) (data not shown).

At the family level, the bacterial composition of the samples also showed differences between the two main groups. Ruminococcaceae and Prevotellaceae families were prevalent in colonized patients ( $p < 0.05$  in both tests), while Enterococcaceae, Streptococcaceae, Lactobacillaceae and Enterobacteriaceae were enriched in *Blastocystis*-free subjects ( $p < 0.05$ ) (see Supplementary Fig. S1, Fig. 5).

Differences in relative abundances of OTUs in faecal microbiota of *Blastocystis*-positive or *Blastocystis*-negative patients have also been identified at the genus level. The OTU relative abundances of several bacterial taxa of Clostridiales like the genera *Acetanaerobacterium*, *Acetivibrio*, *Coprococcus*, *Hespellia*, *Oscillibacter*, *Papillibacter*, *Sporobacter* and

## RESULTATS

*Ruminococcus* were higher in patients colonized with *Blastocystis* than in *Blastocystis*-free individuals ( $p < 0.05$ ). The OTU relative abundance of *Prevotella* was also higher in colonized patients ( $p < 0.05$ ). *Roseburia* and *Faecalibacterium*, two well-known butyrate-producing bacterial genera that seem to play a key role in gut homeostasis<sup>31</sup>, had a significantly higher abundance in colonized than in *Blastocystis*-negative patients (Fig. 6).

### Discussion

Despite numerous studies reporting that *Blastocystis* can cause digestive symptoms, the clinical significance and pathogenic potential of this widespread protist remain unclear. Determining whether or not *Blastocystis* colonization is associated with gut dysbiosis could be therefore important for understanding these scientific issues.

In 2014, Nourrisson *et al.* investigated the potential impact of *Blastocystis* carriage on the enteric microbial community through qPCR quantification of eight major bacterial groups in patients with IBS, or control subjects without any gastrointestinal disorders<sup>32</sup>. *Blastocystis* carriage was shown to be associated with a decrease in *Bifidobacterium* in male IBS patients with constipation. In the control group, no significant differences between both *Blastocystis*-positive and *Blastocystis*-negative patients were observed<sup>32</sup>.

More recently, Andersen *et al.* performed a retrospective analysis of metagenomic data obtained by the MetaHIT Consortium to detect microbial eukaryotic DNA signatures, by applying a co-abundance binning method for constructing CAGs (co-abundance gene groups)<sup>33</sup>. In this study, the presence of *Blastocystis* was negatively correlated with the *Bacteroides*-driven enterotype of the gut microbiome<sup>33</sup>.

Despite these previous surveys, with results that are self-limiting due to the methodology used, no study was conducted, as far as we are aware, to accurately analyse the *Blastocystis*-associated microbiota. For the first time, the *Blastocystis*-associated faecal bacterial microbiota was successfully deciphered using a 16S rDNA gene-based approach and by comparing the microbiota of *Blastocystis*-colonized patients and *Blastocystis*-free individuals. From a technical point of view, assessing the distribution of 16S rRNA gene sequences within a biological sample, called “metagenetics”<sup>29</sup>, represents the current state of the art for the determination of human gut microbiota composition. Our study confirms the accuracy and efficiency of the 16S rDNA gene sequencing approach using the Ion Torrent PGM sequencing platform to determine the composition of faecal microbiota. Recently, this HTS technology has already been successfully used to investigate the gut microbiota of patients with systemic lupus erythematosus<sup>34</sup> or healthy subjects<sup>35</sup>. In our study, one sequencing run performed with

## RESULTATS

96 DNA samples indexed in one Ion 318™ Chip was efficient in obtaining enough high-quality sequence data (i.e. a median read number per index of 29,419) in order to compare the microbiota profiles of 46 *Blastocystis*-colonized patients and 47 *Blastocystis*-free subjects.

Although efforts to define what “normal” gut microbiota means are still progressing, it is well known that the level of diversity and bacterial species composition of the microbiota of healthy individuals differ from those of patients suffering from many metabolic or infectious diseases. The dysbiosis of the intestinal microbiota related to metabolic or infectious diseases like IBS, IBD or enteric pathogens infections<sup>21-23</sup>, that is commonly associated with inflammation of the lower GI tract, is typified by a reduction in bacterial diversity, a decreased abundance of Clostridia and a bloom of facultative anaerobic Gammaproteobacteria like Enterobacteriaceae<sup>36,37</sup>.

In our study, an unexpectedly higher bacterial diversity was found in *Blastocystis*-colonized patients compared to that identified in *Blastocystis*-free individuals. Moreover, at the class level, *Blastocystis*-colonized patients exhibited a higher abundance of Clostridia. In colonized patients, Ruminococcaceae and Prevotellaceae families were also more abundant than in *Blastocystis*-negative patients, whereas Enterobacteriaceae were enriched in these *Blastocystis*-free patients. Additionally, the genera *Faecalibacterium* and *Roseburia*, known to contain butyrate-producing bacteria, had a significantly higher abundance in *Blastocystis*-positive patients. Interestingly, butyrate is considered one of the most important metabolites for maintaining colonic health in humans, as it serves as the major energy source of colonic epithelial cells, has anti-inflammatory properties, and regulates gene expression, differentiation and apoptosis in host cells<sup>38-40</sup>. Significant reductions in the abundance of these bacteria have been identified as markers of dysbiosis in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease<sup>41,42,37</sup>.

Altogether, our results seem to go against the idea that *Blastocystis* is associated with gut dysbiosis related to metabolic or infectious inflammatory diseases of the gastrointestinal tract, and tend to hypothesize that *Blastocystis* colonization is rather associated with a healthy gut microbiota, as suggested previously<sup>17,43</sup>.

To our knowledge, the only parasites that have been associated with an increased bacterial diversity are helminths. Broadhurst *et al.* showed that exposure of rhesus monkeys affected by idiopathic chronic diarrhea to the whipworm *Trichuris trichiura* led to clinical improvement in macaques, and that helminth treatment promoted the restoration of the diversity of mucosal microbial communities<sup>44</sup>. In humans, in a more recent study comparing the composition and diversity of bacterial communities from the faecal microbiota of Malaysian individuals

## RESULTATS

colonized or not by helminths, helminth colonization was associated with greater bacterial species richness<sup>45</sup>. Interestingly, the ability of gastrointestinal nematodes to modulate intestinal inflammation and improve the pathology of chronic intestinal diseases has even led to the development of helminthic therapy. In a recent paper, Cantacessi *et al.* suggested that hookworms administered to patients with chronic inflammatory diseases of the intestinal tract could exert their therapeutic effect, at least in part, by maintaining microbial diversity and thereby restoring microbial homeostasis in the gut<sup>46</sup>.

To date, *Blastocystis* could thus be the only known protist whose colonization would be associated with increased faecal bacteria diversity, and could perhaps even be a beneficial component for gut homeostasis. Interestingly, Lukeš *et al.* have already considered the use of some protists like *Blastocystis* for their potential to stimulate an immune response in a manner beneficial for humans with allergies or IBD<sup>47</sup>, like it was described for some intestinal helminths. If these studies are confirmed, the interaction between *Blastocystis* and humans will need to be recast as commensalistic or even mutualistic, at least under certain conditions. Although the concept of enterotypes has been debated<sup>48,49</sup>, analysis of metagenomic data obtained by the MetaHIT Consortium has revealed differences in *Blastocystis* prevalence among the enterotypes used for gut microbiome stratification<sup>33</sup>. *Blastocystis* seems to be common in patients with *Prevotella*- and *Ruminococcus*-driven enterotypes, whereas individuals with gut microbiota skewed towards *Bacteroides* are less prone to be carriers of *Blastocystis*<sup>33</sup>. The aim of our study was not to determine the enterotypes of patients, but it seems interesting to point out that the OTU relative abundance of *Ruminococcus* and *Prevotella* were higher in *Blastocystis*-positive patients than in *Blastocystis*-negative individuals.

This first metagenetic study designed to decipher *Blastocystis*-associated microbiota was deliberately not focused on patients with IBD or IBS pathologies, for which *Blastocystis* could be implicated in the physiopathology<sup>1,2,7-9</sup>. Indeed, of the 96 patients included in our study, none have Crohn's disease or ulcerative colitis, and only six were IBS patients (2 patients in groups 1 and 3, and 1 patient in groups 2 and 4). However, this study proves that our methodology, based on 16S rDNA gene sequencing in the Ion Torrent PGM platform and bioinformatics analysis of the data, provides a rapid, simple, cost-effective and accurate system with which to compare, in the future, the microbiota of patients with IBD or IBS, colonized or not with *Blastocystis*.

Finally, our work highlighted for the first time the greater bacterial diversity of faecal samples of *Blastocystis*-colonized patients and pointed out that *Blastocystis* colonization seems not to

## RESULTATS

be associated with the gut dysbiosis usually observed in metabolic or infectious diseases of the gastrointestinal tract. Nevertheless, this type of isolated study cannot determine if there are causal relationships between the parasite and gut microbiota. This is like the chicken and the egg question: which came first? Is this finding due to a reduced ability of *Blastocystis* to establish itself in the microbiota of patients with gut dysbiosis, or is *Blastocystis* playing a role in structuring microbiota communities and actively contributing to intestinal homeostasis? To address this, further longitudinal metagenetic studies in humans are required. Our results also highlight the urgent need for developing an effective and reproducible *Blastocystis* animal model. Comparison of the microbiota of *Blastocystis*-free animals before and during the colonization by the protist could continue to advance the frontiers of knowledge in the understanding of the functional impact of *Blastocystis* on the bacterial microbiota.

### **Materials and Methods**

#### **Ethics statement**

This study was approved by the Research Ethics Committee “Comité de Protection des Personnes Sud-Est 6, France” (reference number 2015/CE82), which waived the requirement for informed consent because the experiments did not result in additional constraints for the patients. All the methods used in the study were carried out in accordance with the approved guidelines (World Medical Association’s (WMA) Declaration of Helsinki-Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects).

#### **Study subjects**

The initial epidemiological survey enrolled 788 patients followed up for different pathologies (with/without gastrointestinal symptoms), at 11 French hospitals (Lille, Clermont-Ferrand, Strasbourg, Nimes, Besançon, Lyon, Tours, Nantes, Montpellier, Nice and Créteil) (D. El Safadi, A. Cian, C. Nourrisson, B. Pereira, C. Morelle, P. Bastien, A. P. Bellanger, F. Botterel, E. Candolfi, G. Desoubieux, L. Lachaud, F. Morio, C. Pomares, M. Rabodonirina, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Gantois, G. Certad, L. Delhaes, P. Poirier, and E. Viscogliosi, submitted for publication). In this previous study, one stool sample was obtained from each patient, either in summer or winter, and tested after DNA extraction with the QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen) for the presence of *Blastocystis* using a real-time PCR assay<sup>50</sup>. The overall prevalence of *Blastocystis* was shown to be 18.1% (143/788). A standardized questionnaire was designed to collect information about each participating subject (sex, age, profession, recent travels and destinations, exposure to pets) as well as clinical data,



## RESULTATS

especially regarding the presence of digestive symptoms (diarrhea, vomiting, bloating, constipation and abdominal pain), and diagnosis of IBS or IBD (inflammatory bowel disease). In addition, the observation of intestinal protozoans, fungi, and helminths by direct-light microscopy of faecal smears was also recorded, as well as digestive diseases of bacterial origin.

The first step of the present study was thus to select 48 samples positive for the protist and 48 *Blastocystis*-free samples among the available 788 faecal DNAs. In order to reduce the likelihood of selection bias in the choice of patients, the following strategy was used. The odds ratio (OR) and relative risks (RR) were calculated to quantify how strongly different Boolean variables (including the sampling season and all variables cited above) were associated with the presence or absence of *Blastocystis* in the population of 788 individuals. A logistic regression test was also performed for non-Boolean variables like hospital locations. A forward stepwise logistic regression method using AIC (Akaike information criterion) criterion was then used to select the variables and build the optimal model in order to compute a *Blastocystis* colonization risk score (see Supplementary Sheet S1). The risk scores of each patient were then ranked, a high score being indicative of high *Blastocystis* colonization susceptibility.

Of the 143 *Blastocystis*-positive patients, those with the 24 highest risk scores and those with the 24 lowest scores were selected. The same selection was performed among the 645 *Blastocystis*-free individuals. Therefore, 96 DNA samples corresponding to two groups of 48 patients, positive or negative for *Blastocystis*, comparable in terms of *Blastocystis* colonization risk score, and indirectly in terms of clinical and environmental variables, were used in our study. All statistical analyses were performed in the R environment for statistical computing<sup>51</sup>.

### **DNA extraction monitoring**

Faecal DNAs corresponding to the 96 patients were randomly distributed in a 96-well microplate and the total DNA concentration of each sample was measured using the Quant-iT PicoGreen dsDNA assay (Invitrogen). The global 16S gene DNA copy number was measured by a SybrGreen quantitative PCR method adapted from Maeda *et al.*<sup>52</sup>, which allows both inhibition effect estimation and DNA concentration adjustment. The reaction mixture (15 µL) for the SybrGreen assay performed in RotorGene (Corbett Life Science) contained 2X Brilliant III SybrGreen qPCR Mastermix (Stratagene), primers (GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA, Univ16S\_1048-1067 as the forward primer and

## RESULTATS

ACGTCRTCCMCACCTTCCTC, Univ16S\_1175\_1194 as the reverse primer) with a final concentration of 560 nM and 2 µL of DNA extract as the template. The amplification conditions were 3 min at 94°C, 45 cycles of 15 s at 94°C for denaturation, 22 s at 60°C for annealing and extension, followed by a melting curve from 54°C to 95°C.

### **Metagenetic high-throughput sequencing**

The sequence regions of the 16S rRNA gene spanning variable regions V3–V5 were then amplified using the broad-range forward primer For16S\_519, CAGCMGCCGCGGTAATAC and the reverse primer Rev16S\_926, CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT. Library preparations for amplicons sequencing were performed in a final volume of 100 µL containing 1X PCR buffer, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 U of DNA High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen), 625 nM of each barcoded primer (IDT), 250 µM of each dNTP (Invitrogen), and a concentration-adjusted DNA sample. Each sample was taken following two PCRs, one with the sequencing adapter linked to the forward primer, the other with the sequencing adapter linked to the reverse primer. The two resulting PCR products were equimolarly pooled after DNA purification with NucleoFast® 96 PCR (Macherey Nagel), followed by a Quant-iT PicoGreen ds DNA quantification. The 96-barcoded bidirectional library was sequenced through PGM, Ion Torrent (Life Technologies) with the Ion 318™ Chip and Ion PGM™ 400 Sequencing Kit (Life Technologies), following the recommended protocol.

### **Sequence-based microbiota analysis**

To analyse the Ion Torrent sequencing data, a homemade pipeline was developed using various publicly available tools such as Mothur<sup>53</sup> or EspritTree<sup>54</sup>, databases such as the Silva small subunit RNA database and Ribosomal Database Project (RDP) and Perl/Python scripts (find more information on [http://www.pegase-biosciences.com/pub\\_2014/#ECCB](http://www.pegase-biosciences.com/pub_2014/#ECCB)). The whole pipeline was integrated into a Galaxy server<sup>55</sup> and could be divided into two main modules.

**Preprocessing of FastQ files.** The first module corresponded to a preprocessing step producing a curated and filtered collection of reads using Mothur tools<sup>53</sup>. Firstly, all reads shorter than 150 bases were removed. The remaining sequences were then trimmed to remove the erroneous homopolymers generated by the Ion Torrent PGM sequencer, with a maximum limit for homopolymer length set to 20. Once this filtering was applied, duplicated sequences were grouped so as to save computing time during the alignment and clustering steps. The sequences were then aligned against the Silva database (release 102)<sup>56</sup> provided with Mothur<sup>53</sup>. Sequences with alignments under 100 bases were filtered out.

## RESULTATS

**Clustering analysis and OTU classification.** In the second module, Esprit-Tree software was used for OTU clustering<sup>54</sup>. Briefly, a partition tree was computed using the PbpCluster tool from the Esprit-Tree suite and a consensus sequence was generated for each OTU cluster using a distance level of 0.05. Then, the classification of the reference sequences of each OTU was determined using Mothur against the RDP taxonomy in the Silva database<sup>57</sup>. The output results were grouped into a standard BIOM-formatted table and used for the subsequent analyses<sup>58</sup>.

**Read count normalization.** The total read counts were normalized using the DESeq2 package<sup>59</sup> integrated into QIIME<sup>60</sup> before conducting downstream analyses, following previous recommendations to avoid rarefaction of the read count data<sup>61</sup>.

**Secondary analysis.** Alpha (within a community) and beta (between communities) diversity metrics, as well as taxonomic community assessments, were produced using QIIME 1.8 scripts on the normalized read counts. The following indexes were calculated for each sample: Chao1 bias-corrected, observed OTUs, Shannon and Simpson. Alpha-diversity rarefaction curves were produced by plotting these several diversity metrics against the number of sequences considered from a sample. Alpha diversity indexes of *Blastocystis*-colonized patients were compared to *Blastocystis*-free subjects with the Mann-Whitney-Wilcoxon using R software<sup>51</sup>, at a depth of 273 sequences per sample. To explore the differences in overall microbial community composition across the two groups of patients, the taxonomic Bray-Curtis dissimilarities were calculated after additional filtering of the normalized read counts to remove singletons. The QIIME beta\_diversity\_through\_plots Python script also produced a Principal Coordinates Analysis (PCoA) plot in which the Bray-Curtis dissimilarities between the samples were used to visualize the differences among groups of samples. Environments producing distinct clustering of samples were subjected to significance testing using the nonparametric statistical analysis of similarity (ANOSIM) implemented in the vegan R package<sup>51</sup> with 999 permutations.

The microbiota features obtained from normalized read counts of *Blastocystis*-colonized patients were compared to those of *Blastocystis*-negative subjects with White's nonparametric t-test (Benjamini-Hochberg with False Discovery Rate multiple test correction) using STAMP v 2.0.9<sup>30</sup>. All tests for significance were two-sided, and corrected p-values (i.e. q-values) < 0.05 were considered statistically significant. In parallel, the differences in the relative abundances of the OTUs in faecal microbiota of colonized or not colonized patients were explored using the Mann-Whitney-Wilcoxon test in the R statistics package<sup>51</sup> at different taxa levels.

## RESULTATS

To visualize the overall bacterial microbiota composition among the different groups, a Principal Component Analysis (PCA) plot was produced using the 5 most abundant taxa at the order taxonomic rank and the R FactoMineR package<sup>62</sup>.

### References

1. Tan, K. S. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 639–665 (2008).
2. Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A. & Stensvold, C. R. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* **82**, 1-32 (2013).
3. Bart, A. *et al.* Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect. Dis.* **13**, 389 (2013).
4. Wawrzyniak, I. *et al.* *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **1**, 167–178 (2013).
5. El Safadi, D. *et al.* Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* **14**, 164 (2014).
6. Boorom, K. F. *et al.* Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit. Vectors* **1**, 40 (2008).
7. Tan, K. S. W., Mirza, H., Teo, J. D. W., Wu, B. & MacAry, P. A. Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **12**, 28–35 (2010).
8. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C. P., Delbac, F. & El Alaoui, H. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* **8**, e1002545 (2012).
9. Scanlan, P. D. *Blastocystis*: Past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* **28**, 327–334 (2012).
10. Denoeud, F. *et al.* Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* **12**, R29 (2011).
11. Wawrzyniak, I. *et al.* Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitol. Int.* **61**, 437–442 (2012).
12. Wawrzyniak, I. *et al.* Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genom. Data* **4**, 22–23 (2015).
13. Lim, M. X. *et al.* Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infect. Immun.* **82**, 4789–4801 (2014).
14. Wu, Z., Mirza, H. & Tan, K. S. W. Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts

## RESULTATS

- for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, 27–31 (2014).
15. Wu, Z., Mirza, H., Teo, J. D. W. & Tan, K. S. W. Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *Biomed Res. Int.* **2014**, 209163 (2014).
  16. Scanlan, P. D. & Marchesi, J. R. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *ISME J.* **2**, 1183–1193 (2008).
  17. Scanlan, P. D. *et al.* The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* **90**, 326–330 (2014).
  18. Petersen, A. M. *et al.* Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* **48**, 638–639 (2013).
  19. Krogsgaard, L. R., Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V. & Bytzer, P. The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 507–513.e2 (2015).
  20. Rossen, N. G. *et al.* Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1039–1044 (2015).
  21. Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F. & Guarner, F. The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 599–608 (2012).
  22. Lyra, A. & Lahtinen, S. Dysbiosis of the intestinal microbiota in IBS in *Current concepts in colonic disorders* (ed. Dr Lule, G.) 261–276 (InTech, 2012).
  23. Pham, T. A. N. & Lawley, T. D. Emerging insights on intestinal dysbiosis during bacterial infections. *Curr. Opin. Microbiol.* **17**, 67–74 (2014).
  24. Raetz, M. *et al.* Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- $\gamma$ -dependent elimination of Paneth cells. *Nat. Immunol.* **14**, 136–142 (2013).
  25. Torres, M. F. *et al.* Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *J. Med. Microbiol.* **49**, 209–215 (2000).
  26. Galván-Moroyoqui, J. M., del Carmen Domínguez-Robles, M., Franco, E. & Meza, I. The interplay between Entamoeba and enteropathogenic bacteria modulates epithelial cell damage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e266 (2008).

## RESULTATS

27. Verma, A. K., Verma, R., Ahuja, V. & Paul, J. Real-time analysis of gut flora in *Entamoeba histolytica* infected patients of Northern India. *BMC Microbiol.* **12**, 183 (2012).
28. Lindgreen, S., Adair, K. L. & Gardner, P. An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Sci. Rep.* **6**, 19233 (2015).
29. Esposito, A. & Kirschberg, M. How many 16S-based studies should be included in a metagenomic conference? It may be a matter of etymology. *FEMS Microbiol. Lett.* **351**, 145–146 (2014).
30. Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P. & Beiko, R. G. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**, 3123–3124 (2014).
31. Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V. & Gasbarrini, A. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.* **5**, 23 (2013).
32. Nourrisson, C. *et al.* *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One* **9**, e111868 (2014).
33. Andersen, L. O., Bonde, I., Nielsen, H. B. & Stensvold, C. R. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**, fiv072 (2015).
34. Hevia, A. *et al.* Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus. *MBio* **5**, e01548-14 (2014).
35. Milani, C. *et al.* Assessing the fecal microbiota: an optimized Ion Torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One* **8**, e68739 (2013).
36. Winter, S. E. & Bäumler, A. J. Why related bacterial species bloom simultaneously in the gut: Principles underlying the ‘like will to like’ concept. *Cell. Microbiol.* **16**, 179–184 (2014).
37. Loh, G. & Blaut, M. Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes* **3**, 544–555 (2012).
38. Brestoff, J. R. & Artis, D. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol.* **14**, 676–684 (2013).
39. Hamer, H. M. *et al.* Review article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**, 104–119 (2008).
40. Tan, J. *et al.* The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* **121**, 91–119 (2014).
41. Machiels, K. *et al.* A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and

## RESULTATS

- Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1275-1283 (2013).
42. Sokol, H. *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16731–16736 (2008).
  43. Scanlan, P. D. & Stensvold, C. R. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* **29**, 523–529 (2013).
  44. Broadhurst, M. J. *et al.* Therapeutic helminth infection of macaques with idiopathic chronic diarrhea alters the inflammatory signature and mucosal microbiota of the colon. *PLoS Pathog.* **8**, e1003000 (2012).
  45. Lee, S. C. *et al.* Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2880 (2014).
  46. Cantacessi, C. *et al.* Impact of experimental hookworm infection on the human gut microbiota. *J. Infect. Dis.* **210**, 1–4 (2014).
  47. Lukeš, J., Kuchta, R., Scholz, T. & Pomajbíková, K. (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends Parasitol.* **30**, 377-385 (2014).
  48. Koren, O. *et al.* A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1002863 (2013).
  49. Knights, D. *et al.* Rethinking ‘enterotypes’. *Cell Host Microbe* **16**, 433–437 (2014).
  50. Poirier, P. *et al.* Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 975–983 (2011).
  51. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
  52. Maeda, H. *et al.* Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **39**, 81–86 (2003).
  53. Schloss, P. D. *et al.* Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541 (2009).
  54. Cai, Y. & Sun, Y. ESPRIT-Tree: Hierarchical clustering analysis of millions of 16S rRNA pyrosequences in quasilinear computational time. *Nucleic Acids Res.* **39**, e95

## RESULTATS

- (2011).
55. Goecks, J., Nekrutenko, A. & Taylor, J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* **11**, R86 (2010).
  56. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590-6 (2013).
  57. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5261–5267 (2007).
  58. McDonald, D. *et al.* The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *Gigascience* **1**, 7 (2012).
  59. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
  60. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. methods* **7**, 335–336 (2010).
  61. McMurdie, P. J. & Holmes, S. Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003531 (2014).
  62. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR : An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* **25**, 1–18 (2008).

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Programmes Orientations Stratégiques from the University de Lille 2 and Fonds Hospitalier d’Aide à l’Emergence from the CHRU de Lille, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut Pasteur de Lille. AC was supported by a PhD fellowship from the University de Lille 2 and the Institut Pasteur de Lille.

### Author contributions statement

The *Blastocystis* investigation Group collected the samples, clinical and environmental data. C.A., G.E., E.V. and M.C. conceived and designed the experiment. A.C. and S.M. conducted the wet-lab experiments. G.E. and A.L. conducted the dry-lab work. C.A., G.E. and M.C. analyzed the results. M.C., E.V. and C.A. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

### The *Blastocystis* Investigation Group:

Dima El Safadi<sup>4</sup>, Gabriela Certad<sup>5</sup>, Laurence Delhaes<sup>6</sup>, Céline Nourrisson<sup>7,8</sup>, Bruno Pereira<sup>7</sup>, Philippe Poirier<sup>7,8</sup>, Christelle Morelle<sup>9</sup>, Patrick Bastien<sup>9</sup>, Laurence Lachaud<sup>9,10</sup>, Anne-Pauline



## RESULTATS

Bellanger<sup>11</sup>, Françoise Botterel<sup>12</sup>, Ermanno Candolfi<sup>13</sup>, Guillaume Desoubeaux<sup>14</sup>, Florent Morio<sup>15</sup>, Christelle Pomares<sup>16</sup>, Meja Rabodonirina<sup>17</sup>, Ivan Wawrzyniak<sup>8</sup>, Frédéric Delbac<sup>8</sup>

<sup>4</sup>Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologies et ses applications, Université Libanaise, Laboratoire de Microbiologie Santé et Environnement, Tripoli, Lebanon.

<sup>5</sup>Direction de la Recherche Médicale, GHICL, Lille, France.

<sup>6</sup>Département de Parasitologie-Mycoologie, CHU de Lille, Lille, France / Current address : Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, Groupe Hospitalier Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>7</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, CHU Gabriel-Montpied, Clermont-Ferrand, France

<sup>8</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal-Université d'Auvergne-CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France

<sup>9</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, CHU de Montpellier, CNRS UMR 5290 / IRD 224 / UM1, Université de Montpellier 1, Montpellier, France

<sup>10</sup>Laboratoire de Microbiologie, CHU de Nîmes, Nîmes, France

<sup>11</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, CHU de Besançon, Besançon, France

<sup>12</sup>Laboratoire de Mycologie-Parasitologie, AP-HP Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

<sup>13</sup>Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale de Strasbourg, Université de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>14</sup>Service de Parasitologie-Mycoologie-Médecine Tropicale, CHU de Tours / CEPR Inserm U1100 Equipe 3, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

<sup>15</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, EA1155-IICiMed, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>16</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycoologie CHU de Nice, C3M Inserm U1065, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France

<sup>17</sup>Service de Parasitologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

# RESULTATS

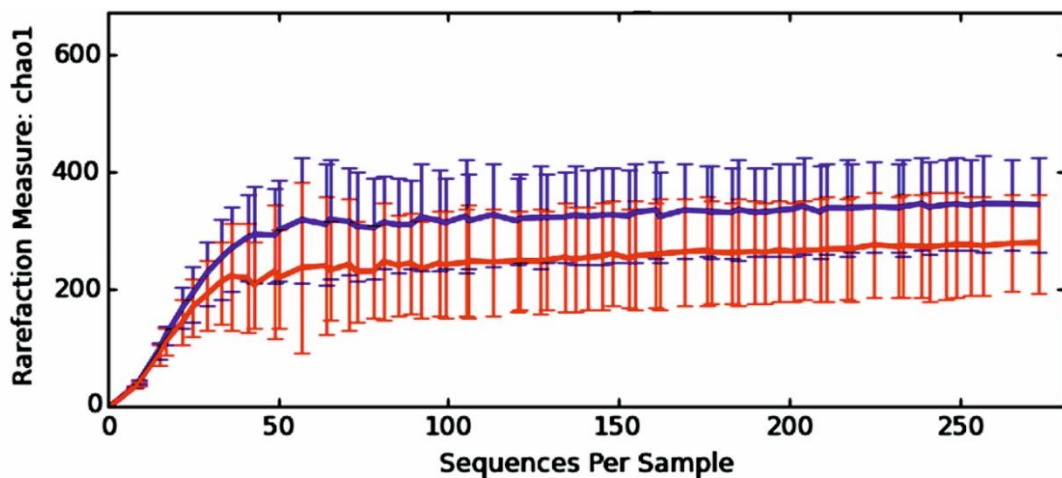
## Additional information

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Table 1.** Means of bacterial richness and diversity estimates in groups of patients colonized or not with *Blastocystis*. Statistical analysis to compare both main groups was performed using the Mann–Whitney–Wilcoxon test. \* Significance testing of richness and diversity estimators was conducted using Mann–Whitney–Wilcoxon test as implemented in the stats package in R 50.

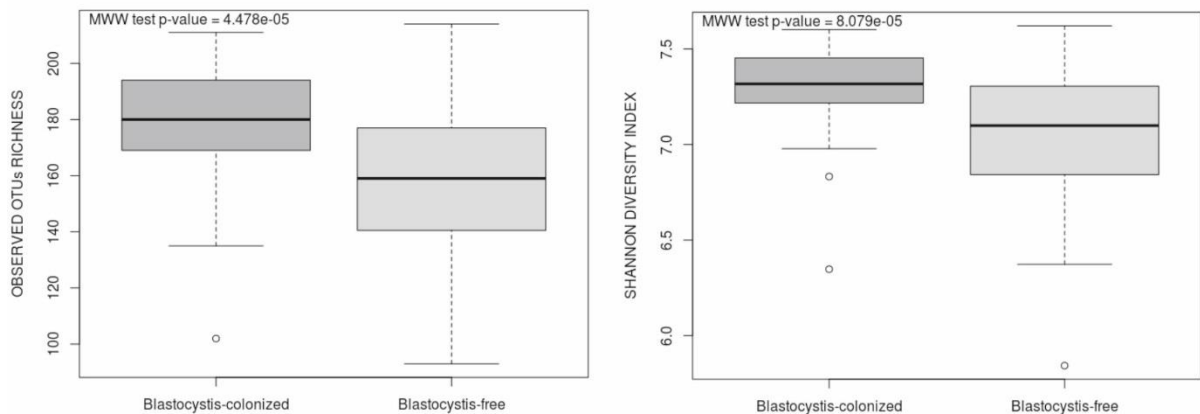
Group of patients	Richness estimator		Diversity index				
	Observed OTUs	p-value <sup>a</sup>	Chao 1	p-value <sup>a</sup>	Shannon	p-value <sup>a</sup>	Simpson p-value <sup>a</sup>
<i>Blastocystis</i> -colonized	178.85	4.48e-05	340.20	1.66 e-04	7.30	8.08e-05	0.78
<i>Blastocystis</i> -free	157.64		273.22		7.05		0.73

**Figure 1:** Rarefaction curve calculated for Chao1 index demonstrating the higher bacterial diversity found among *Blastocystis*-colonized patients. The blue line indicates *Blastocystis*-colonized patients and the red line indicates *Blastocystis*-free individuals.

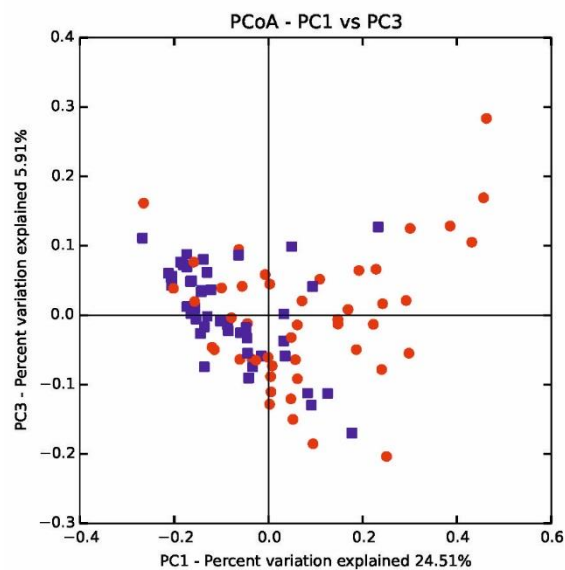


# RESULTATS

**Figure 2:** Boxplots of observed OTUs richness and Shannon diversity indexes distinguishing between patients colonized or not by *Blastocystis*. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test. Plotted are interquartile ranges (IQRs; boxes), medians (dark lines in the boxes), and the lowest and highest values within 1.5 times IQR from the first and third quartiles (whiskers above and below the boxes). Both alpha-diversity metrics were calculated using 273 normalized sequences per sample.

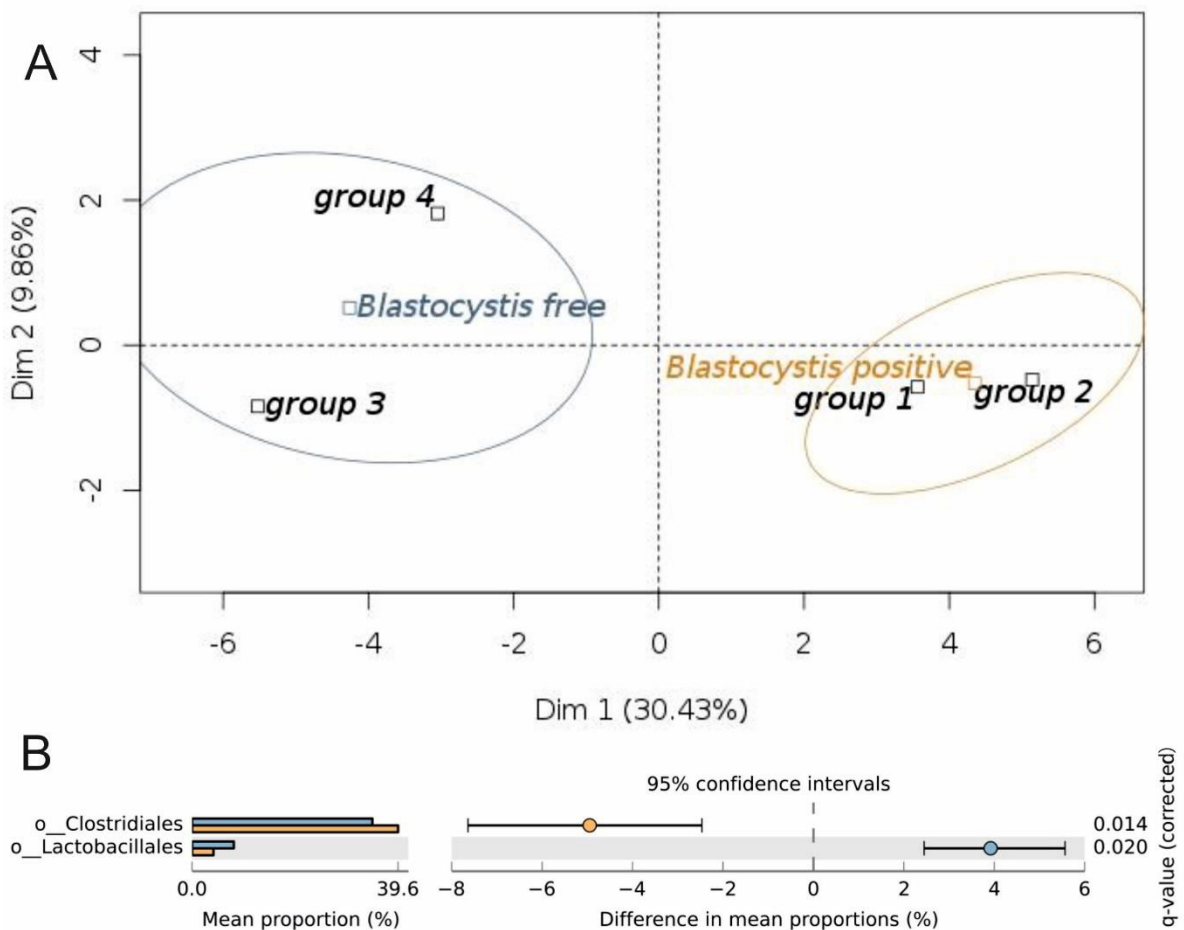


**Figure 3:** PCoA of the microbial communities in *Blastocystis*-colonized and *Blastocystis*-free patient samples. The blue dots indicate *Blastocystis*-colonized patients and the red dots indicate *Blastocystis*-negative individuals.



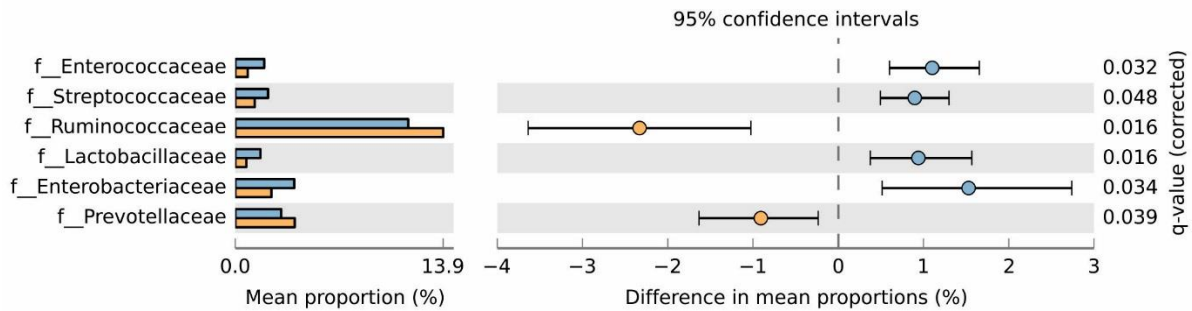
## RESULTATS

**Figure 4.** Analyses of the bacterial microbiota composition at the order-level taxonomic rank. (A) PCA plot comparing the four patient groups according to their microbiota patterns for the 5 most abundant microbial communities at the order-level taxonomic rank. Groups 3 and 4 define the *Blastocystis*-free cluster (in blue); groups 1 and 2 define the *Blastocystis*-positive cluster (in orange). (B) proportion of sequences assigned to each main group at the order-level taxonomic rank (level 4) for Clostridiales and Lactobacillales illustrated using STAMP, along with means for each group and the significance of the difference in mean proportions using White's nonparametric t-test with Benjamini-Hochberg FDR multiple test correction. The blue and orange bars represent *Blastocystis*-free patients and *Blastocystis*-positive patients, respectively.

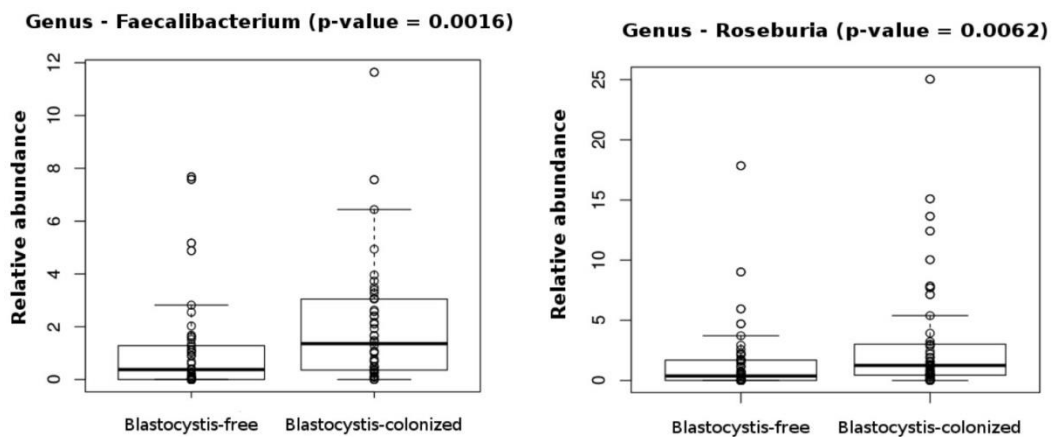


# RESULTATS

**Figure 5.** Proportion of sequences assigned to each main group at the family taxonomic rank (level 5), along with the means for each group and significance of difference in mean proportions using White's nonparametric t-test with Benjamini-Hochberg FDR multiple test correction, illustrated using STAMP. Significant differences (q-value < 0.05) are represented here between the two main groups. Blue and orange bars represent *Blastocystis*-free patients and *Blastocystis*-colonized patients, respectively.



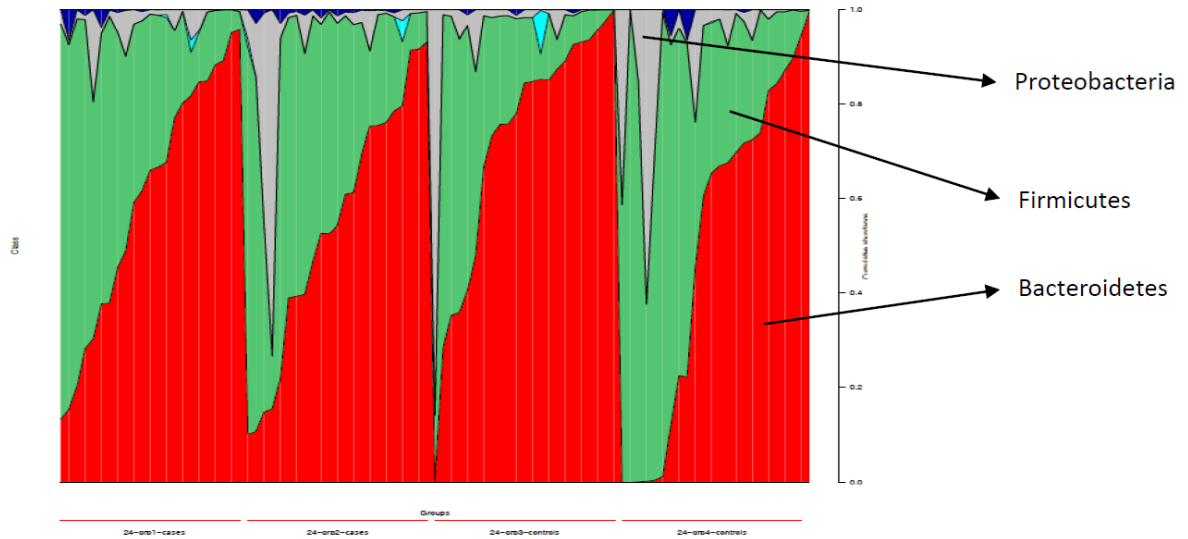
**Figure 6.** Relative abundances of OTUs of *Faecalibacterium* and *Roseburia* genera that differ significantly between *Blastocystis*-colonized and *Blastocystis*-free patients. The Mann-Whitney-Wilcoxon test was used to evaluate the two groups.



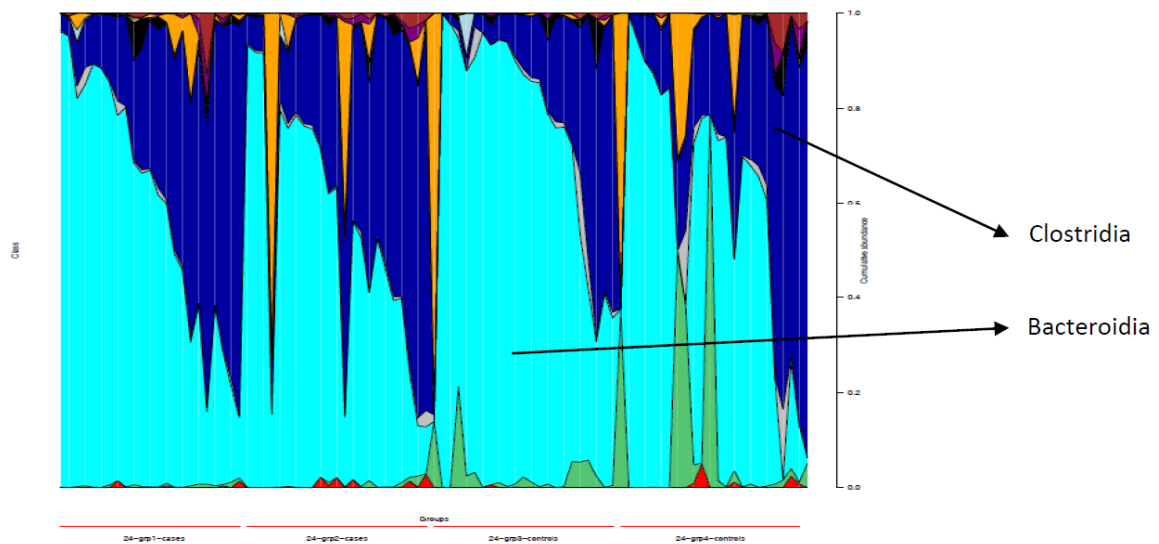
# RESULTATS

**Supplementary Figure S1:** Faecal bacterial communities present in the different samples (DNA samples from patients' groups 1, 2, 3 and 4) analyzed in this study. Plots of relative abundances of OTUs at four taxonomic levels: pylum (a), class (b), order (c) and family (d). The most abundant and interesting taxa are labeled with arrows.

a)

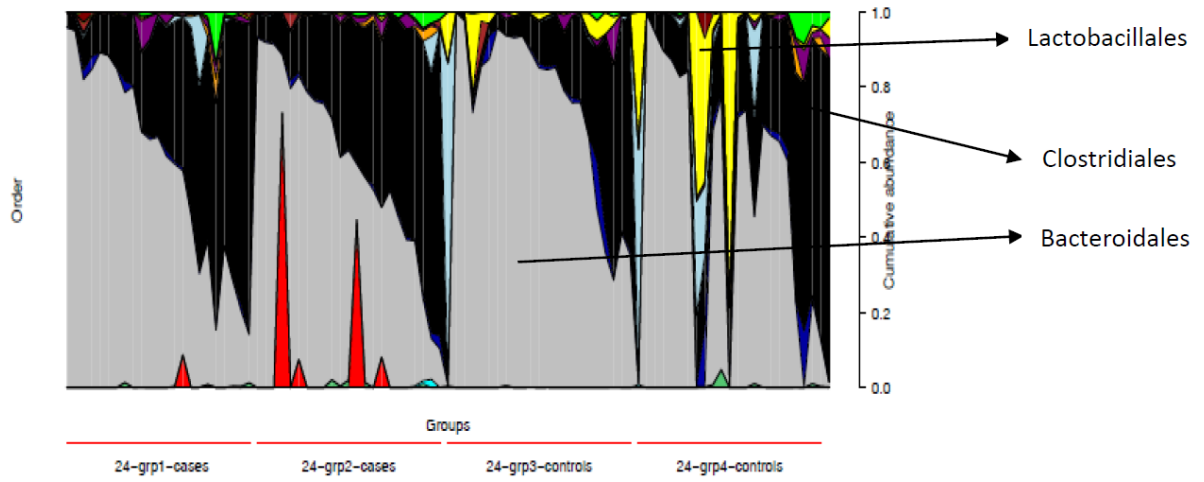


b)

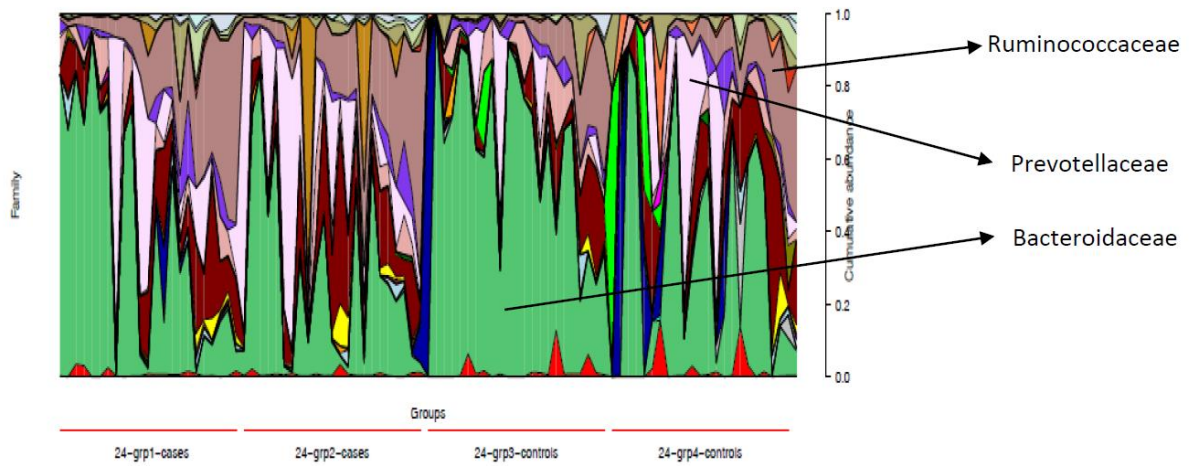


# RESULTATS

c)



d)



## RESULTATS

**Supplementary Table S1:** Reads metrics from output sequence data (PGM quality-approved, trimmed and filtered data) and mean number of preprocessed reads per index after the high-quality filtering approach. \*Three outlier samples (indexes 18, 63 and 50 belonging to groups 1, 2 and 3 respectively), were discarded before the subsequent bioinformatics analyses.

	Mean read length (bases)	Median read length (bases)	Minimum read number/index	Mean read number/index	Median read number / index	Mean preprocessed reads number/index
All reads <sup>a</sup>	272.67	273	14,617	42,603.26	41,956.00	29,485.03
Reads from <i>Blastocystis</i> - colonized patients	271.98	274	14,617	43,604.02	44,533.50	30,541.19
Reads from <i>Blastocystis</i> -free individuals	273.34	272	21 039	41,623.79	41,057.00	28,451.34



## III. Développement d'un modèle animal de blastocystose

### A) Introduction

Le réel frein à la connaissance et à la compréhension de la pathophysiologie de *Blastocystis* sp. est l'absence, à ce jour, d'un modèle animal reproductible. Avec la mise en place de ce modèle animal, le passage de nombreux isolats appartenant à différents STs et disponibles en culture axénique permettrait de comparer la virulence de ces STs tout en clarifiant la dynamique d'infection du parasite. D'après les données disponibles dans la littérature, la souris ne serait pas un hôte naturel de *Blastocystis* sp. ce qui limite considérablement son intérêt dans le cadre du développement d'un modèle animal. Aussi, nous avons décidé d'initier ce développement en utilisant le rat comme modèle.

### B) Matériels et méthodes

#### a. Cultures et contrôle de l'axénisation

Grâce aux collaborations de l'équipe BDPEE, en particulier, avec des laboratoires des Pays-Bas et de Singapour, plusieurs isolats axéniques de *Blastocystis* sp. ont pu être obtenus. Ainsi, un isolat de ST4 (WR1 isolé de rongeurs) et un isolat de ST7 (B isolé chez l'Homme) maintenus en culture axénique liquide (isolés et axénisés par K. Tan, Singapour) et 4 isolats de *Blastocystis* sp. ST1 (52110), ST3 (9.3.10), ST4 (20b4.10) et ST8 (17c82b), tous isolés chez l'Homme et maintenus en culture axénique solide (isolés et axénisés par l'équipe de T. Van Gool, Amsterdam, Pays-Bas) étaient disponibles au laboratoire. Les cultures axéniques liquides ont été réalisées à 37°C en milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco™) supplémenté avec 10% de sérum de cheval décomplémenté (origine Nouvelle Zélande, Gibco™), 1 µg/ml de glutamine et 1 U/ml de Penicilline/Streptomycine (Gibco™) (Ho et al., 1993). Le parasite a ainsi été cultivé en tubes de 15 ml dans 5 ml de milieu en condition d'anaérobiose dans des jarres BD GasPak™ EZ (BD) contenant des sachets générant une atmosphère anaérobie (Sigma-Aldrich). Ces cultures liquides ont été repiquées toutes les 48 à 72 h. Pour ce qui est des cultures axéniques en milieu solide maintenues à 37°C, l'IMDM (Gibco™) a été supplémenté avec 20% de sérum de cheval décomplémenté (origine Nouvelle Zélande, Gibco™) et 1 U/ml de Penicilline/Streptomycine (Gibco™). L'agar (Euromedex) a été ajouté au milieu afin de permettre sa solidification. Les boîtes de pétri sur lesquelles le parasite a été étalé sont placées dans des jarres Anaerobie Mart (Mart<sup>R</sup>)

## RESULTATS

et l'anaérobiose a été réalisée grâce à un Anoxomat<sup>TM</sup> (Mart<sup>R</sup>). Cet appareil réalise un échange gazeux permettant d'obtenir très rapidement une atmosphère anaérobie. Ces cultures solides ont été repiquées toutes les semaines.

Avant toute inoculation des animaux, les cultures de parasites ont été contrôlées pour la présence éventuelle d'autres germes. Pour cela, une observation microscopique (Nikon Eclipse 50i) de la culture a été réalisée afin de contrôler l'absence d'autres parasites eucaryotes et/ou de développement bactérien. En parallèle, un échantillon de la culture a été transmis à la Plateforme d'Expérimentation et de Hautes Technologies Animales (PLETHA) de l'Institut Pasteur de Lille afin de réaliser des tests sur des milieux non sélectifs comme des géloses Trypcase soja enrichies ou non avec 5% de sang de mouton ou encore dans des bouillons de Trypcase soja afin de vérifier toute absence de croissance bactérienne. La gélose Trypcase soja est un milieu non sélectif contenant deux peptones (source de carbone) permettant le développement d'une grande variété de germes. Le sang de mouton est ajouté à cette gélose permettant ainsi la culture de microorganismes plus exigeants et la détermination des réactions hémolytiques produites par de nombreuses espèces bactériennes comme les streptocoques et les staphylocoques. La culture en bouillon de Trypcase soja est quant à elle utilisée afin de pouvoir détecter des bactéries aérobies ou anaérobies potentiellement présentes en très faible quantité dans la culture du parasite.

### **b. Autorisations de projets pour l'expérimentation animale**

En février 2013, le décret et les arrêtés transposant la nouvelle directive européenne relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ont été appliqués. Aussi, avant de pouvoir réaliser mes expérimentations animales, une demande d'autorisation de projet a dû être rédigée et transmise au ministère de la Recherche afin d'être évaluée. Cependant, les délais d'évaluation étant assez longs, les expérimentations ont pu être débutées dès réception du récépissé du ministère. Avec cette nouvelle directive, tout changement dans le protocole d'expérimentation animale doit être soumis au ministère de la Recherche au travers d'une nouvelle demande d'autorisation de projet ce qui a été le cas pour notre dernière expérimentation par voie intra-caecale. Vu la taille de ces dossiers, ceux-ci n'ont pas été inclus en Annexes de ce mémoire.

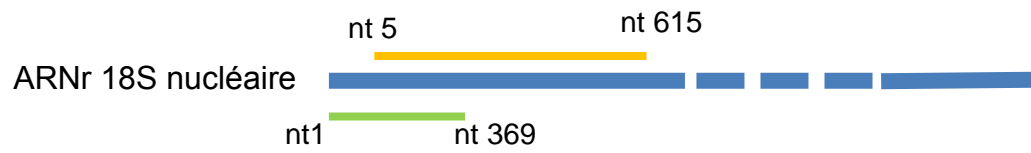
### **c. Choix des animaux et contrôles avant infection**

Pour réaliser les expérimentations, de jeunes rats Wistar de 5 semaines fournis par la société Charles River (L'arbresle, France) et des rats Nude du même âge fournis par la

## RESULTATS

PLETHA de l'Institut Pasteur de Lille ont été utilisés. A chaque expérimentation, les rats étaient hébergés dans des cages en portoirs ventilés dans lesquelles la boisson et l'alimentation étaient disponibles *ad libitum*. Dès leur arrivée, les rats ont été traités avec un glucocorticoïde de synthèse, le phosphate sodique de dexaméthasone (Merck, Lyon, France) à 4 mg/l dans l'eau de boisson permettant ainsi d'induire une immunodépression chez les rats Wistar et d'accentuer cette immunodépression chez les rats Nude. Le traitement avec la dexaméthasone a été maintenu tout au long de l'expérimentation. Cette immunodépression avait pour but de faciliter l'infection par le parasite.

A ce jour, la recherche de *Blastocystis* sp. dans les animaleries n'est pas systématique. Aussi, le statut sanitaire des animaux se doit d'être contrôlé dès leur arrivée afin de vérifier l'absence du parasite. Cette recherche a été effectuée par PCR en point final à partir d'ADN total extrait des selles des animaux. Cette extraction d'ADN total a été réalisée à l'aide du kit QIAamp® DNA stool (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Pour ce qui est de la PCR, elle ne pouvait pas être réalisée à l'aide des amorces couramment utilisées pour la recherche de *Blastocystis* sp. (Scicluna et al., 2006). En effet, bien que ce couple d'amorces peut amplifier le gène de l'ADNr 18S de tous les STs du parasite, il s'avère qu'il est aussi capable, par manque de spécificité, d'amplifier le gène homologue de plusieurs autres organismes dont le rat. Aussi, afin de déterminer un couple d'amorces plus spécifiques, les séquences du gène de l'ADNr 18S disponibles sur le site de la GenBank pour tous les isolats de STs connus de *Blastocystis* sp. ont été extraites et alignées à l'aide du logiciel SeaView version 4.4.1 (Gouy et al., 2010). A partir de cet alignement, deux régions conservées ont été identifiées afin de déterminer un couple d'amorces spécifiques du genre *Blastocystis* et pouvant amplifier tous les STs du parasite sans amplifier le gène de l'ADNr 18S du rat (**Figure A6**). Les séquences de ces amorces sont les suivantes : BL18S 1F (5'-GCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTAGT-3') et BL 18S 1R (5'-TCGAACCCAAATTCTTCGTTACCCGTTA-3'). Brièvement, les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl contenant 5 µl de tampon 10X, 2 µl de MgSO<sub>4</sub> à une concentration de 50 mM, 1 µl d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dNTPs) à une concentration de 10 mM, 1 µl de chacune des deux amorces sens et antisens à une concentration de 10 µM, 1 µl de Platinum *Taq* High Fidelity DNA polymerase (Invitrogen®) ainsi que 3 µl d'ADN extrait des selles sur un thermocycleur MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycler®). Les conditions d'amplification étaient les suivantes: 2 min à 94°C puis 35 cycles de 30 s à 94°C / 30 s à 62°C / 50 s à 68°C suivis d'une étape d'élongation finale de 10 min à 68°C. Les amplicons obtenus pour chaque PCR ont été déposés avec du tampon de charge (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 40% (m/v) sucrose) en présence d'un



**Figure A6 :** Localisation des fragments du gène de l'ADNr 18S amplifiés par la PCR de Scicluna et al. (2006) en jaune et par la PCR mise au point dans notre étude en vert. La séquence de l'ADNr 18S de référence en bleu est celle d'un isolat de *Blastocystis* sp. ST4 de rat (isolat WR1, numéro d'accèsion à la Genbank : AY590113).

## RESULTATS

marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, Eurogentec) sur gel d'agarose à 1% (2 g d'agarose pour 200 ml de tampon Tris/Borate/EDTA (TBE)), dans lequel sont ajoutés 3 µl de Bromure d'Ethidium (BET) pour visualiser l'ADN. La migration s'effectuait à 170 Volts avant observation sous un transilluminateur. Si la PCR était positive, les amplicons attendus devaient avoir une taille d'environ 400 pb.

### **d. Infections expérimentales par *Blastocystis* sp.**

Pour les 2 premières expérimentations réalisées par gavage gastrique (voie orale) avec les cultures liquides des isolats WR1 de ST4 et B de ST7, un tube de 48 h de culture a été, le jour de l'infection, centrifugé à 3000 g pendant 5 min afin de récupérer le culot et estimer le nombre de parasites. Une dilution au 1/100<sup>ème</sup> a été réalisée avec un aliquot du culot pour le comptage des parasites sur lames Fast-Read 102<sup>®</sup> (Dutscher). Une dose de 10<sup>7</sup> parasites a été ajustée dans 200 µl de milieu de culture préchauffé à 37°C afin d'éviter tout choc thermique pour les parasites. Cette dose de parasite a été inoculée par gavage gastrique aux animaux à l'aide d'une canule à gavage (Dutscher) pour le premier groupe. Les rats contrôles du second groupe ont été gavés avec 200 µl de milieu ne contenant pas de parasites. Les animaux ont ensuite été suivis pendant 6 semaines. Durant les expérimentations, des examens cliniques regroupant l'évaluation de l'aspect du poil, la léthargie, l'état de prostration ainsi que la présence de diarrhée ont été réalisés 3 fois par semaine. Si un des rats devait montrer un état d'affaiblissement ou de souffrance au cours de l'expérimentation, une euthanasie par inhalation d'une concentration croissante en CO<sub>2</sub> (>70%) était prévue. Les selles des animaux infectés et non infectés ont été récoltées 2 à 3 fois par semaine. Pour cela, les rats d'une même cage étaient transférés dans une cage de « transition » ne contenant ni litière, ni eau, ni nourriture pendant 1 h 30 afin de pouvoir récupérer une quantité suffisante de fécès avec des pinces stériles. Les selles ont été ensuite stockées à -20°C avant de procéder à l'extraction d'ADN total à l'aide du kit QIAamp<sup>®</sup> DNA stool (Qiagen) et de réaliser une PCR à l'aide du couple d'amorces BL18S 1F et BL 18S 1R selon les conditions décrites précédemment. Les amplicons visualisés de la taille attendue ont été envoyés à la société Genoscreen (Institut Pasteur de Lille) pour purification et séquençage direct.

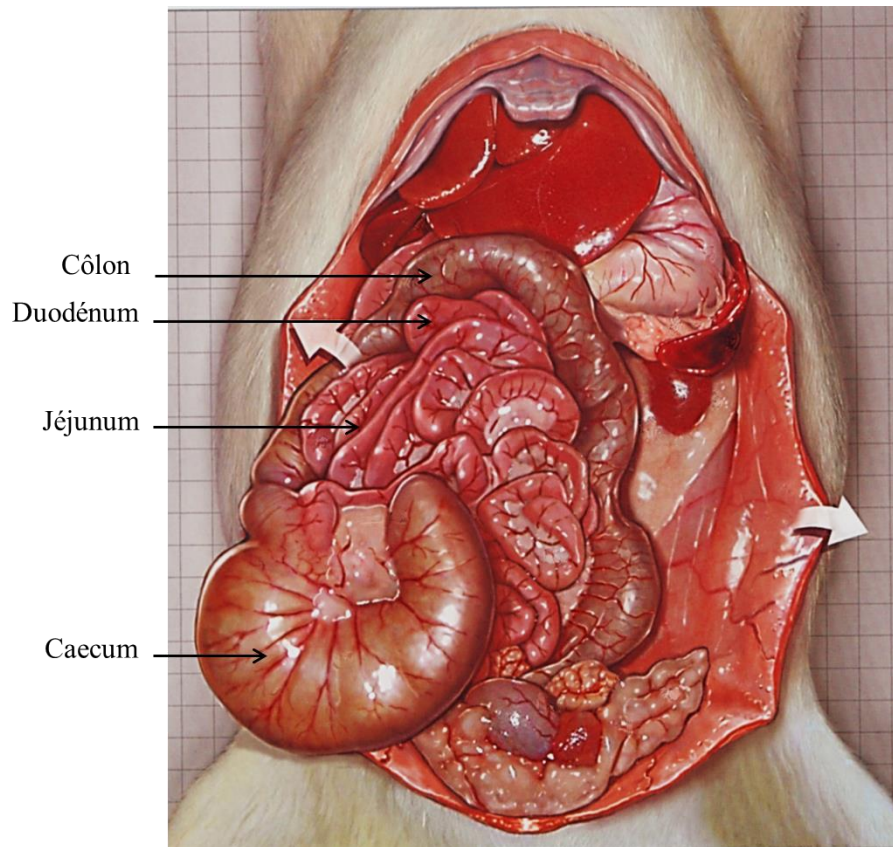
Après 6 semaines d'infection, les animaux ont été euthanasiés comme indiqué précédemment. Les organes d'intérêts (duodénum, jéjunum, caecum et côlon) ont été prélevés (**Figure A7**). Une première partie de chaque organe a été fixée dans du formol neutre à 10% afin d'immobiliser les structures cellulaires et tissulaires avant d'être inclus en paraffine. La

## RESULTATS

paraffine étant un composé hydrophobe, les morceaux de tissus coupés et placés dans une cassette ont été passés successivement et automatiquement dans différents bains (2 bains d'alcool 95° pendant 1 h, 3 bains d'alcool absolu pendant 1 h, 3 bains de toluène pendant 30 min, 2 bains de paraffine pendant 30 min puis 1 h) grâce à un « circulateur » (Leica TP1050). Les tissus ont ensuite été inclus en paraffine pour former un bloc permettant de réaliser les coupes histologiques d'une épaisseur de 5 µm grâce à un microtome rotatif (Leica RM2235). Les coupes obtenues ont alors été montées sur lames puis colorées à l'hématoxyline-éosine-safranine (HES) avant observation sous un microscope Leica DMRB équipé d'une camera Leica digital connectée à un logiciel de traitement d'images (MCID software, Cambridge, Royaume-Uni). En parallèle, une deuxième partie de chaque organe a été placée dans un tube Eppendorf de 2 ml et conservé à -80°C avant d'en extraire l'ADN total à l'aide du kit NucleoSpin Tissue® (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. A partir des ADNs obtenus, une PCR a été réalisée avec le couple d'amorces BL18S 1F et BL18S 1R selon les conditions décrites ci-dessus. Les amplicons visualisés à la taille attendue ont été envoyés à la société Genoscreen (Institut Pasteur de Lille) afin d'être purifiés et séquencés.

Pour l'expérimentation réalisée avec l'isolat 17c82b de ST8 en milieu solide, le même protocole détaillé ci-dessus a été utilisé et seule la préparation de l'inoculum a été différente. En effet, les parasites ont été récoltés à l'aide d'une ose et repris dans du milieu de culture préchauffé à 37°C. Comme indiqué précédemment, une dilution a été réalisée afin de déterminer la concentration en parasites et l'ajuster à  $10^7$  parasites dans 200 µl afin de réaliser l'infection des animaux.

La quatrième expérimentation réalisée quant à elle avec l'isolat B de ST7 maintenu en milieu liquide a nécessité une approche de micro-chirurgie pour une administration en intra-caecal. La préparation de l'inoculum est identique aux deux premières expérimentations mais le mode d'administration a été modifié. Les animaux ont d'abord été anesthésiés par inhalation de vapeur d'isoflurane (Baxter, Maurepas, France). Une fois endormis, une incision d'un centimètre maximum a été réalisée sur l'abdomen du rat afin d'identifier le caecum et d'injecter directement le parasite dans cet organe. Les examens cliniques ont été réalisés quotidiennement pour ces animaux. En ce qui concerne le suivi de l'infection et l'euthanasie des animaux, le protocole décrit ci-dessus a été utilisé.



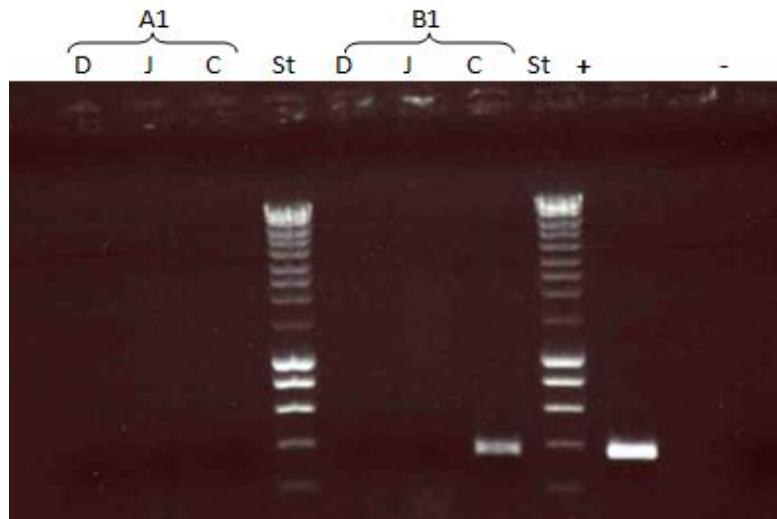
**Figure A7 :** Représentation de l'appareil digestif du rat. Les organes d'intérêts (duodénum, jéjunum, caecum et côlon) prélevés afin de réaliser les analyses histologiques et moléculaires sont indiqués par des flèches. (Figure adaptée de l'anatomie viscérale de Marc Aprahamian, Université Louis Pasteur de Strasbourg).

## C) Résultats

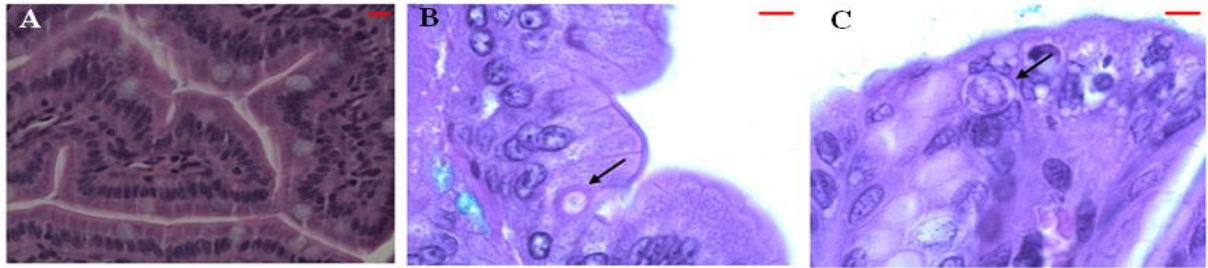
### a. Infection expérimentale avec un isolat de *Blastocystis* sp. de ST4 par voie orale

La culture liquide de l'isolat WR1 de ST4 maintenue au laboratoire a été testée pour la présence éventuelle d'autres germes avant l'infection des animaux. Le contrôle microscopique ainsi que l'étalement de la culture sur des géloses de milieux non sélectifs ne montraient pas, comme nous nous y attendions, la présence d'autres parasites eucaryotes ou de croissance bactérienne. En parallèle, l'absence de *Blastocystis* sp. chez les rats avant infection a été confirmée par PCR. Après infection, les selles des deux groupes de rats (infectés et non-infectés) ont été collectées tous les 3 jours mais les PCR réalisées avec les ADN extraits à partir de ces selles n'ont pas été concluantes ne permettant pas de mettre *Blastocystis* sp. en évidence. En revanche, celles réalisées à partir des ADN extraits des différents tissus prélevés après euthanasie des animaux ont permis de mettre en évidence la présence de *Blastocystis* sp. dans l'échantillon « caecum plus côlon » des animaux infectés (**Figure A8**). En effet, dans cette expérimentation, les morceaux de tissus de caecum et de côlon ont été prélevés ensemble pour l'extraction d'ADN. Par contre, les deux organes ont pu être analysés séparément sur un plan histologique. D'ailleurs, les coupes obtenues pour le duodénum, le caecum et le côlon des animaux infectés mettaient en évidence la présence d'aspects vacuolaires anormaux de certaines cellules épithéliales (**Figures A9B, A9C, A10B, A10C, A11B, A11C**) qui pourraient correspondre à *Blastocystis* sp. ce qui n'était pas observé chez les rats contrôles (**Figures A9A, A10A, A11A**). Cependant la coloration HES ne permettait pas de le confirmer. En outre, les formes observées pouvant être assimilées au parasite semblaient être localisées entre les cellules de l'épithélium intestinal (**Figures A9B, A10B, A11C**). De plus, le chorion ainsi que la muscularis mucosae (voir **Figure A4A**) semblaient maintenir leur intégrité et aucune réaction inflammatoire n'a été observée.

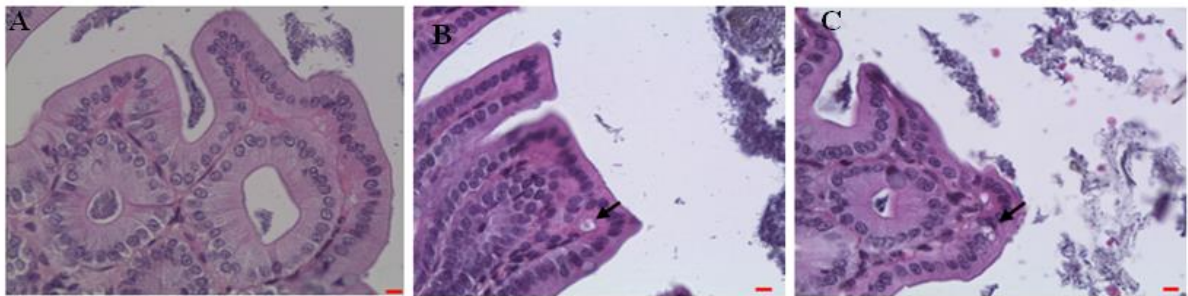




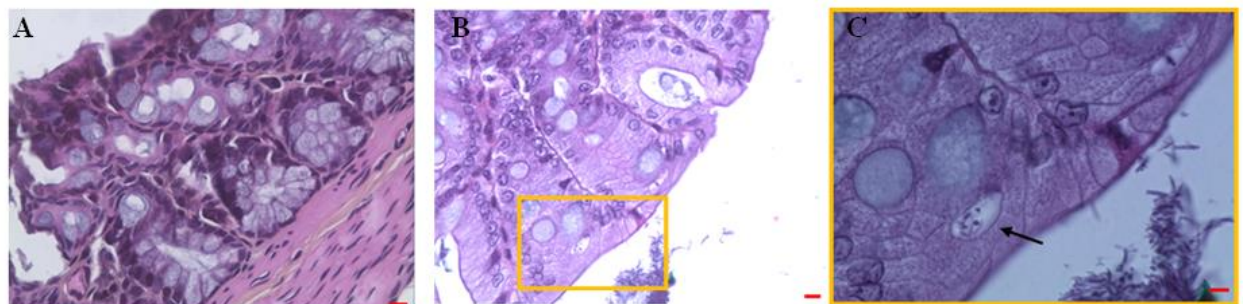
**Figure A8:** Amplification par PCR des ADNs extraits des tissus de rats non infectés (A1) et infectés (B1). D : Duodénum, J : Jéjunum, C : Côlon plus caecum. + : Contrôle positif (ADN extrait de la culture de *Blastocystis* sp. ST4), - : Contrôle négatif (ADN remplacé par de l'eau), St : Standard de poids moléculaire.



**Figure A9** : Sections histologiques de la muqueuse du duodénum de rats Wistar après coloration HES. (A) Rat contrôle non infecté et traité à la dexaméthasone depuis 42 jours. (B-C) Rat infecté et traité à la dexaméthasone depuis 42 jours. La présence d'aspects vacuolaires anormaux au niveau des cellules épithéliales est indiquée par des flèches noires et pourraient correspondre à la présence du parasite. Echelle = 10  $\mu$ m.



**Figure A10** : Sections histologiques de la muqueuse du caecum de rats Wistar après coloration HES. (A) Rat contrôle non infecté et traité à la dexaméthasone depuis 42 jours. (B-C) Rat infecté et traité à la dexaméthasone depuis 42 jours. La présence éventuelle de parasites est indiquée par des flèches noires. Echelle = 10  $\mu$ m.



**Figure A11** : Section histologique de la muqueuse du côlon de rats Wistar après coloration HES. (A) Rat contrôle non infecté et traité à la dexaméthasone depuis 42 jours. (B) Rat infecté et traité à la dexaméthasone depuis 42 jours. (C) Agrandissement d'une zone de la photo B présentant un aspect vacuolaire anormal. La présence éventuelle d'un parasite est indiquée par une flèche noire. Echelle = 10  $\mu$ m

## RESULTATS

### **b. Infection expérimentale avec des isolats de *Blastocystis* sp. de ST7 et ST8 par voie orale**

Afin de faciliter l'infection par le parasite, deux expérimentations ont été réalisées avec des rats Nude immunodéprimés et traités de plus à la dexaméthasone afin d'accroître leur niveau d'immunodépression. Le même protocole que pour l'infection expérimentale avec l'isolat de *Blastocystis* sp ST4 décrite précédemment a été suivi. Cependant, les deux expériences réalisées avec les isolats B de ST7 et 17c82b de ST8 n'ont pas été concluantes. En effet, les PCR réalisées à partir d'ADNs extraits des selles ou des tissus n'ont pas permis de mettre en évidence le parasite. En ce qui concerne les analyses histologiques des organes prélevés, aucune modification ou altération des différents tissus ainsi qu'aucune forme vacuolaire anormale n'ont été observées.

### **c. Infection expérimentale avec un isolat de *Blastocystis* sp. de ST7 par voie intra-caecale**

Au vu des résultats peu concluants obtenus lors des infections précédentes, nous avons suggéré que l'acidité gastrique des animaux était sans doute néfaste pour les formes vacuolaires du parasite. Pour s'affranchir de cette acidité, la technique d'infection s'est portée sur la microchirurgie afin de pouvoir injecter le parasite directement dans le caecum des animaux. Cependant, l'expérience ainsi réalisée avec l'isolat B de ST7 s'est révélée infructueuse puisque les PCR réalisées à partir des ADN extraits des tissus et des selles se sont toutes avérées négatives.

## **D) Conclusion**

Notre première expérimentation réalisée avec un isolat de ST4 administré par voie orale à des rats Wistar immunodéprimés a permis d'identifier, sur des coupes histologiques de caecum, de duodenum et de côlon, des formes pouvant correspondre au parasite mais sans possibilité de le confirmer pour l'instant. Pourtant, le parasite a été détecté par PCR à partir d'ADN extrait d'un mélange de tissus de caecum et de côlon. Ces organes ayant été prélevés après 42 jours d'infection, cette observation suggérerait l'établissement d'une infection chronique chez l'animal. Cependant, toutes les autres expérimentations réalisées se sont avérées infructueuses avec différents isolats et différents modes d'infection.

## IV. Etude de génomique comparative

Préambule : Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal «*Genomics Data* ».

### a. Introduction

Plusieurs études récentes obtenues essentiellement *in vitro* suggèrent que le pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp. serait ST-dépendant (Wu et al., 2014a, b ; Yason et al., 2016). L'hypothèse la plus rationnelle serait alors que de simples différences génomiques entre STs en lien avec la présence ou l'absence de certains facteurs de virulence puissent expliquer ces variations du pouvoir pathogène. En ce sens, une approche de génomique comparative pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. En 2011, le génome d'un isolat de *Blastocystis* sp. ST7 a été annoté et publié (Denoeud et al., 2011) et pourrait ainsi servir de base de comparaison pour ce type d'étude. Aussi, en collaboration avec la société Genoscreen de Lille, le génome d'un isolat de ST4 a été séquencé par la méthode « Illumina ». L'assemblage de ce génome devait être réalisé selon la technique de "mapping" en utilisant le génome de *Blastocystis* sp. ST7 comme référence mais ceci n'a pas été possible du fait de la forte divergence des deux STs comparés. Aussi un assemblage *de novo* a donc dû être mené pour le ST4 suivi de son annotation. L'assemblage et l'annotation fonctionnelle des gènes identifiés pour l'isolat de ST4 ont été réalisés et ont permis de mener une comparaison entre les données issues de ce génome et celles issues de celui de ST7.

### b. Résultats

Wawrzyniak I., Courtine D., Osman M., Hubans-Pierlot C., **Cian A.**, Nourisson C., Chabe M., Poirier P., Bart A., Polonais V., Delgado-Viscogliosi P., El Alaoui H., Belkorchia A., van Gool T., Tan K.S.W., Ferreira S., Viscogliosi E., Delbac F. (2015). Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genom Data* 4: 22-23

### c. Conclusion

Cette analyse comparative a d'abord montré que le génome de l'isolat de ST4 était d'une taille significativement plus réduite (12,91 Mpb) que celui de l'isolat de ST7 (18,8 Mbp). Le génome de ST4 contenait moins de gènes dupliqués que celui du ST7 ce qui pouvait expliquer en partie cette différence de taille. Le nombre de gènes estimé pour le ST4 était de 5713 ce qui était légèrement inférieur aux 6020 gènes du ST7. En outre, 30% des gènes du ST4 n'avait pas d'orthologues dans le génome de ST7 ce qui témoigne de la diversité

## RESULTATS

génétiq ue importante entre STs de *Blastocystis* sp. Au niveau des protéases qui sont considérées chez *Blastocystis* sp. comme des facteurs de virulence, 32 ont été prédites comme sécrétées pour l'isolat de *Blastocystis* sp. ST7 et 22 seulement pour l'isolat de *Blastocystis* sp. ST4 suggérant une virulence éventuellement plus importante de l'isolat de ST7. Néanmoins, 7 des protéases identifiées au sein de l'isolat de ST4 n'ont pas d'orthologues chez l'isolat de ST7. Ces données de génomique comparative ne pouvaient donc pas expliquer à elles seules les différences de virulence de ces deux STs observées *in vitro*. Afin d'avoir un meilleur aperçu du niveau de virulence de ces STs, il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression de ces protéases par des approches combinées de transcriptomique et de protéomique. De plus, l'analyse et l'annotation de génomes d'autres STs apporteraient une meilleure connaissance de la diversité génétique en relation avec le pouvoir pathogène de ce parasite.

### **Ma contribution dans cette étude :**

- ✓ Participation à l'annotation du génome
- ✓ Lecture et correction du manuscrit

## RESULTATS

### **Article 9: Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4**

**Ivan Wawrzyniak,<sup>a</sup> Damien Courtine,<sup>a</sup> Marwan Osman,<sup>b</sup> Christine Hubans-Pierlot,<sup>c</sup> Amandine Cian,<sup>b</sup> Céline Nourrisson,<sup>a</sup> Magali Chabe,<sup>b</sup> Philippe Poirier,<sup>a</sup> Aldert Bart,<sup>d</sup> Valérie Polonais,<sup>a</sup> Pilar Delgado-Viscogliosi,<sup>b</sup> Hicham El Alaoui,<sup>a</sup> Abdel Belkorchia,<sup>a</sup> Tom van Gool,<sup>d</sup> Kevin S.W. Tan,<sup>e</sup> Stéphanie Ferreira,<sup>c</sup> Eric Viscogliosi,<sup>b</sup># Frédéric Delbac<sup>a</sup>#**

Clermont Université, Université Blaise Pascal-Université d'Auvergne-CNRS, UMR 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France<sup>a</sup> ; Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille Nord de France, France<sup>b</sup>; Genoscreen Institut Pasteur, Lille, France<sup>c</sup>; Department of Medical Microbiology, Section Parasitology, Center for Infection and Immunity Amsterdam, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands<sup>d</sup>; Laboratory of Molecular and Cellular Parasitology, Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore<sup>e</sup>

#Address correspondence to Frédéric Delbac, [frederic.delbac@univ-bpclermont.fr](mailto:frederic.delbac@univ-bpclermont.fr), and Eric Viscogliosi, [eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr](mailto:eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr)

# RESULTATS

## Abstract

The intestinal protistan parasite *Blastocystis* is characterized by an extensive genetic variability with 17 subtypes (ST1-ST17) described to date. Only the whole genome of a human ST7 isolate was previously sequenced. Here we report the draft genome sequence of *Blastocystis* ST4-WR1 isolated from a laboratory rodent at Singapore.

## Keywords

*Blastocystis* subtype 4-isolate WR1, Illumina-HiSeq, Whole genome, Annotation using maker gene annotation pipeline

## Specifications

Organism/cell line/tissue	<i>Blastocystis</i> ST4
Strain	WR1
Sequencer or array type	Illumina-HiSeq 2000
Data format	Processed
Experimental factors	Laboratory rodent and cultured axenically
Experimental features	Draft genome sequence of the intestinal parasite <i>Blastocystis</i> ST4-WR1 isolate
Consent	n/a
Sample source location	Clermont-Ferrand, France

## Direct link to data

Direct link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JPUL00000000.1>

## Experimental Design, Materials and Methods

The stramenopile *Blastocystis* is a common anaerobic protist living in the digestive tract of several animal groups (1). Its prevalence in human often exceeds 5% in industrialized countries (1) and can reach 100% in developing countries (2). Although the role of *Blastocystis* as a human pathogen remains unclear, it has been associated with acute or chronic digestive disorders and some epidemiological surveys have suggested an association with Irritable Bowel Syndrome (IBS) (3, 4). In patients with IBS, *Blastocystis* seems to be associated with a decrease of the fecal microbiota protective bacteria, *Bifidobacterium* sp. and *Faecalibacterium prausnitzii* (5). The life cycle of the parasite is poorly documented. Among the parasitic forms described in the literature, the vacuolar stage which is maintained *in vitro* in axenic culture, is the most easily recognizable and the most frequently observed in stool samples. *Blastocystis* exhibits an extensive genetic diversity and seventeen subtypes (ST1-ST17) have been identified based on the gene coding for the small-subunit ribosomal RNA

## RESULTATS

(6) among which the first nine are found in humans. The whole genome of a human *Blastocystis* ST7 isolate was previously sequenced. Briefly, it consists of an 18.8 Mbp nuclear genome with 6,020 predicted genes (7) and a circular genome of 29 kbp (8) located within mitochondria-like organelles (MLO). Other MLO genomes with conserved gene synteny have also been sequenced from *Blastocystis* ST1, ST3 and ST4 isolates (9, 10). Here we report the sequencing of the *Blastocystis* ST4-WR1 genome from an isolate of a laboratory rodent and cultured axenically (11). Genomic DNA was isolated using a Qiagen DNeasy blood and tissue kit and sequencing was performed with the Illumina HiSeq 2000 system (Genoscreen, Lille, France). A total of 43,855,085 of 100-bp high quality paired-end reads were generated and were *de novo* assembled using the IDBA-ud algorithm (12). The output was then scaffolded using SSPACE (13) and gaps were filled by Gapfiller software (14). In total, 1,301 scaffolds from 494 bp to 133,271 bp were obtained, with a scaffold  $N_{50}$  of 29,931 bp. The draft genome sequence of *Blastocystis* ST4 has a deduced total length of 12.91 Mbp and a G+C content of 39.7%. Assembly also provided a circular DNA molecule of 27,717 bp in size with a G+C content of 21.9% corresponding to the whole MLO genome sequence. Genes were carried out using the Maker gene annotation pipeline (15). The Maker pipeline was set with the results of *ab initio* genes predictors Augustus (16) and SNAP (17), ESTs of *Blastocystis* ST7 (5) and ST1 (18), proteins sequences of *Blastocystis* ST7 (5) and 414 genes of ST4-WR1 manually designed. Basic information about the assembled genome and predicted genes are shown in Table 1. Gene functions were annotated by BLAST2GO (19) and BLAST analyses with NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). 183 tRNA were predicted using tRNAscan-SE 1.21 (20). The preliminary annotation data revealed that *Blastocystis* ST4-WR1 nuclear genome harbors 5,721 protein-coding genes. The presence of proteases was determined using BLAST against MEROPS database (21), and secreted proteases were identified using SIGNALP 3.0 (22) and WoLF PSORT (23). WoLF PSORT was also used to determine the distribution sites of proteins (Table2). Compared with the ST7, the percentage of ST4 and ST7 proteins located in the same site is approximately identical. Finally OrthoMCL (24) was applied to compare both ST4 and ST7 genomes. This comparative analysis revealed that the ST4 genome contains less duplicated genes than ST7 and that more than 30% of ST4 genes have no ortholog in the ST7 genome at an *E* value cutoff of  $10^{-5}$ . This also led to the identification of new candidate genes, in particular some potential virulence factors that may be involved in the physiopathology of this parasite. Indeed the use of SIGNALP and Wolf PSORT permitted to identify 20 secreted proteases. Among these proteases 7 are specific to the ST4 compared to the ST7. Sequencing and annotation of additional STs (ST1, ST2, ST3 and ST8) genomes



## RESULTATS

are under progress and should be helpful for a better understanding of the genetic diversity, pathogenesis, metabolic potential and genome evolution of this highly prevalent human parasite.

**Nucleotide sequence accession numbers.** This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession JPUL00000000. The version described in this paper is version JPUL02000000.

### **Conflict of interest**

Authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

This work was funded by grants from the French National Center for Scientific Research (CNRS), the INSERM, the Programme Orientations Stratégiques from the University of Lille 2 and the Institut Pasteur of Lille. MO was supported by a PhD fellowship from the Conseil National de la Recherche Scientifique and the Azm & Saade Association from Lebanon and AC by a PhD fellowship from the Pasteur Institute of Lille and the University of Lille 2.

### **References**

1. Tan KS, Mirza H, Teo JD, Wu B, Macary PA. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12 (2010) 28-35.
2. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Meloni D, Texier C, Delbac F, Alaoui HE.. *Blastocystis* an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.* 1 (2013) 167-78
3. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivares CP, Delbac F, El Alaoui H. 2012. New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002545.
4. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, Cian A, Poirier P, Wawrzyniak I, Delbac F, Dabboussi F, Delhaes L, Seck M, Hamze M, Riveau G, Viscogliosi E. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* 14 (2014) 164.
5. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F, Dapoigny M, Poirier P. 2014. *Blastocystis* Is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects. *PLoS One.* 3 (2014) e111868

## RESULTATS

6. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Atim Imeede C, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG. Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist* 164 (2013) 497–509.
7. Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, Viscogliosi E, Brochier-Armanet C, Couloux A, Poulain J, Segurens B, Anthouard V, Texier C, Blot N, Poirier P, Ng GC, Tan KS, Artiguenave F, Jaillon O, Aury JM, Delbac F, Wincker P, Vivares CP, El Alaoui H. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 12 (2011) R29.
8. Wawrzyniak I, Roussel M, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KS, Vivares CP, Delbac F, Wincker P, El Alaoui H. Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int. J. Parasitol.* 38 (2008) 1377-1382.
9. Perez-Brocal V, Clark CG. Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization. *Mol. Biol. Evol.* 25 (2008) 2475-2482.
10. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol.* 12 (2012) 263-73.
11. Chen XQ, Singh M, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Moe KT, Yap EH. Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitol. Res.* 83 (1997) 313-8.
12. Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. IDBA-UD: a *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28 (2012) 1420-1428.
13. Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* 27 (2011) 578-9.
14. Boetzer M, Pirovano W. Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome Biol.* 13 (2012) R56.
15. Holt C, Yandell M. MAKER2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. *BMC Bioinformatics* 12 (2011) 491.
16. K. J. Hoff and M. Stanke. WebAUGUSTUS - a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 41 (2013) W123-8
17. Korf I. Gene finding in novel genomes. *BMC Bioinformatics* 5 (2004) 59
18. Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, Clark CG, Roger AJ. Organelles that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol.* 18 (2008) 580-5

## RESULTATS



19. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21 (2005) 3674-3676.
20. Lowe, T.M. and Eddy, S.R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, 25 (1997) 955-964
21. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 40 (2014) D343-350.
22. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8 (2014) 785-786.
23. Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K.. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*. 35 (2007) W585-587.
24. Li L, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res*. 13 (2003) 2178-2189.

## RESULTATS

**Table 1.** Genome statistics and intron features of *Blastocystis* ST4 and ST7

	<i>Blastocystis</i> ST4	<i>Blastocystis</i> ST7
Genome assembly size	12.9 Mb	18.8 Mb
G + C content	39.6%	45.2%
Number of genes	5,721	6,021
Average gene size	1,386 bp	1,299 bp
Gene with introns	92.7%	84.6%
Average exon number per gene	5.06	4.58
Average length of introns	33	50
Average length of proteins	416	359
MLO genome size	27,815 bp	29,270 bp
MLO G +C content	21.94%	20.03%
Number of MLO genes	45	45

### Situation de la blastocystose au Liban et plus globalement au Moyen-Orient

Lors de la mise en place d'une collaboration active entre l'équipe BDPEE et le centre AZM de Tripoli au Liban en 2012, une étude publiée quelques années auparavant rapportait la prévalence de parasites intestinaux dans la région du Nord-Liban (Hamze et al., 2004). Cette étude incluait, au total, plus de 17000 patients qui avaient été suivis à l'Hôpital Islami de Bienfaisance de Tripoli entre 1997 et 2001. Après examen macroscopique et microscopique des selles, cette enquête montrait qu'environ 33% de ces patients étaient parasités (**Tableau A2**). De plus, cette prévalence était globalement stable pendant les 5 années de l'étude puisqu'elle oscillait approximativement entre 31 et 37%. Les parasites intestinaux les plus fréquemment retrouvés étaient *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba coli* et *Giardia intestinalis* ce qui a été en partie confirmée dans l'une de nos études (**Article 3**). Ces résultats indiquaient donc que le Nord-Liban était une région très touchée par ce type d'infections ce qui pouvait essentiellement s'expliquer par une qualité insuffisante de l'eau de consommation. En effet, cette région rencontre des problèmes majeurs en termes de vétusté des réseaux de distribution d'eau, d'accès à de l'eau traitée et d'assainissement entraînant ainsi un risque de contamination potentielle de l'eau souterraine. En outre, les données de Hamze et al. (2004) avaient été obtenues par observation microscopique des selles qui est une méthode peu sensible pour l'identification des protozoaires et certains d'entre eux comme *Blastocystis* sp. n'avaient pas été recherchés. Aussi, les premières enquêtes épidémiologiques utilisant des approches moléculaires de détection ont été réalisées au Liban dans la région de Tripoli afin d'obtenir des données concernant la prévalence et la distribution des STs de ce parasite dans ce pays (**Articles 2 et 3**).

La première étude menée au Liban ciblait ce que l'on appelle la population générale ou du « tout-venant » c'est-à-dire une cohorte de patients symptomatiques ou asymptomatiques suivis pour diverses pathologies dans plusieurs hôpitaux de Tripoli (**Article 2**). Ainsi 220 échantillons de selles ont été collectés et une observation microscopique directe « à l'état frais » des selles a été réalisée montrant que 42 patients étaient infectés par *Blastocystis* sp. soit une prévalence globale de 19%. Cependant, cette méthode de détection, qui est la plus répandue en routine dans les laboratoires hospitaliers du fait de son faible coût, est également connue pour être moins sensible que les méthodes moléculaires du fait de la difficulté à identifier, en particulier, la forme kystique du parasite (Stensvold et al., 2007 ; Poirier et al., 2011 ; Santos et Rivera, 2013 ; Kumarasamy et al., 2014 ; Abu-Madi et al., 2015 ; Forsell et al., 2016) et pour être fortement dépendante de l'expérience de l'observateur (Bart et al.,

**A**

Année	Sexe	Patients examinés	Patients parasités	Prévalence (%)
1997	M	1660	506	30,48
	F	2128	699	32,84
	Total	3788	1205	31,81
1998	M	1468	453	30,85
	F	1989	624	31,37
	Total	3457	1077	31,15
1999	M	1425	423	29,68
	F	1944	690	35,49
	Total	3369	1113	33,03
2000	M	1466	498	33,96
	F	2003	793	35,59
	Total	3469	1291	37,21
2001	M	1254	412	32,85
	F	1789	615	34,37
	Total	3043	1027	33,74
Total		17126	5713	33,35

M : masculin.  
F : féminin.

**B**

Année	Sexe	A. lumbricoïdes		Taenia spp.		H. nana		Enter. vermicularis		Trichuris trichiura		Ent. coli		G. lamblia		Ent. histolytica		Trich. intestinalis		Total
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
1997	M	186	36,75	13	2,56	2	0,40	1	0,20	2	0,40	183	36,17	100	19,76	18	3,56	5	0,98	506
	F	244	34,91	27	3,86	1	0,14	4	0,57	0	0	283	40,49	112	16,02	25	3,58	10	1,43	699
	Total	430	35,68	40	3,31	3	0,25	5	0,41	2	0,17	466	38,67	212	17,59	43	3,57	15	1,25	1205
1998	M	161	35,54	7	1,54	3	0,66	3	0,66	0	0	174	38,41	74	16,34	26	5,74	7	1,55	453
	F	215	34,46	44	7,05	0	0	3	0,48	0	0	262	41,99	76	12,18	30	4,80	8	1,29	624
	Total	376	34,91	51	4,73	3	0,28	6	0,56	0	0	436	40,48	150	13,93	56	5,20	15	1,39	1077
1999	M	163	38,53	13	3,07	2	0,47	0	0	0	0	147	34,76	77	18,21	22	5,20	4	0,94	423
	F	272	39,42	21	3,04	4	0,58	3	0,43	0	0	272	39,42	85	12,32	25	3,62	13	1,88	690
	Total	435	39,08	34	3,05	6	0,54	3	0,27	0	0	419	37,65	162	14,56	47	4,22	17	1,52	1113
2000	M	176	35,34	13	2,61	2	0,40	2	0,40	2	0,40	177	35,55	101	20,28	24	4,82	5	1,00	498
	F	309	38,97	24	3,02	2	0,25	2	0,25	0	0	291	36,70	117	14,75	44	5,55	10	1,26	793
	Total	485	37,57	37	2,85	4	0,31	4	0,31	2	0,16	468	36,18	218	16,93	68	5,28	15	1,16	1291
2001	M	157	38,11	8	1,94	1	0,24	0	0	0	0	160	38,84	60	14,56	23	5,58	5	1,21	412
	F	239	38,86	18	2,92	2	0,32	2	0,32	1	0,16	248	40,33	77	12,52	24	3,90	10	1,63	615
	Total	396	38,56	26	2,53	3	0,29	2	0,19	1	0,10	408	39,73	137	13,34	47	4,58	15	1,46	1027
Total		2122	37,14	188	3,3	19	0,33	20	0,35	5	0,09	2197	38,45	879	15,39	261	4,57	77	1,35	5713

N : nombre de cas.  
M : masculin.  
F : féminin.

**Tableau A2** : Diagnostiques parasitaires chez des patients du Nord-Liban entre 1997 et 2001 (A) et prévalence des différents parasites identifiés (B). (Hamze et al., 2004).

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

2013). Cette sous-estimation a d'ailleurs été confirmée dans la seconde étude menée au Liban (**Article 3**) mais aussi dans notre enquête multicentrique réalisée en France (**Article 5**) (voir ci-dessous). Dans cette dernière étude, la sensibilité de l'examen microscopique des selles n'était que de 48,5% comparée à la PCR en temps réel.

Même si la prévalence de *Blastocystis* sp. observée dans la population générale libanaise (19%) était probablement sous-estimée, elle restait néanmoins importante et pouvait être comparée à celles obtenues dans d'autres pays du Moyen Orient avec la même méthode de détection. Ainsi, en Iran, la prévalence de ce parasite était extrêmement variable puisque comprise entre 2,2 et 27,5% (Haghighi et al., 2009 ; Rostami Nejad et al., 2010 ; Daryani et al., 2012 ; Moosavi et al., 2012 ; Khoshnood et al., 2015 ; Pestehchian et al., 2015 ; Fallahi et al., 2016 ; Sharif et al., 2015 ; Jafari et al., 2016 ; Kiani et al., 2016). En Israël, elle atteignait globalement 11,8% dans la seule enquête disponible (Ben-Shimol et al., 2014). Au Qatar, cette prévalence ne dépassait pas les 6,9% (Abu-Madi et al., 2010, 2015, 2016) et était de 2,3% en Arabie Saoudite (Hassen Amer et al., 2016). Pourtant, dans ce dernier pays, une enquête récente montrait une prévalence de *Blastocystis* sp. de 78,9% en utilisant toujours la même méthode de détection par microscopie (Ahmed et al., 2015). A la vue de ces données, on note d'abord, et ce n'est pas spécifique au Moyen-Orient, de fortes différences de prévalence au sein d'un même pays comme en Iran ou en Arabie Saoudite par exemple et en utilisant la même méthode de détection. De telles différences de valeur de prévalence restent difficilement explicables même si ces études englobaient, sans rentrer dans les détails, des cohortes différentes et étaient réalisées dans différentes régions des pays concernés. Il est donc plus que probable que l'expérience de l'observateur soit la cause principale de ces variations. Cependant, malgré ce facteur majeur à prendre en compte, on note que la prévalence observée dans certains pays du Moyen-Orient est du même ordre de grandeur (environ 20%) que celle décrite dans la population générale au Liban.

En utilisant des méthodes d'identification moléculaires, la prévalence du parasite atteignait 44,4% aux Emirats Arabes Unis (AbuOdeh et al., 2016) et 71,1% au Qatar (Abu-Madi et al., 2015) alors qu'elle ne dépassait pas les 7% par microscopie dans ce dernier pays (voir ci-dessus). Par contre en Iran, elle restait faible et de l'ordre de 6,5% par PCR (Badparva et al., 2014). Cette approche moléculaire plus sensible révèle donc, à l'exception de l'Iran, des prévalences plus importantes pouvant même atteindre 70%. Au Liban, une autre étude menée par l'équipe (voir perspectives ci-dessous) est en cours et vise à identifier les facteurs de risque animaux et environnementaux de transmission de *Blastocystis* sp. à l'Homme. Pour ce faire, cette enquête englobe, en particulier, une cohorte d'une centaine de patients

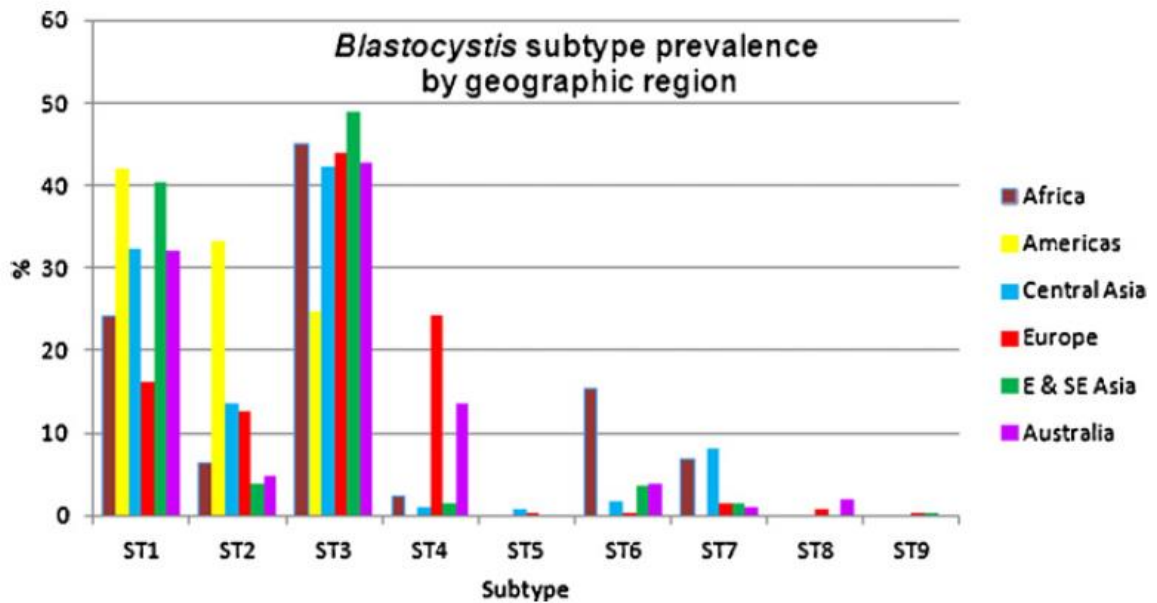
## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

symptomatiques ou asymptomatiques suivis dans les hôpitaux de Tripoli tout à fait similaire à celle analysée dans l'Article 2. Les premières données obtenues par PCR en temps réel (Poirier et al., 2011) pour cette cohorte montre une prévalence d'environ 30% ce qui nous semble une valeur réaliste dans la population générale au Nord-Liban.

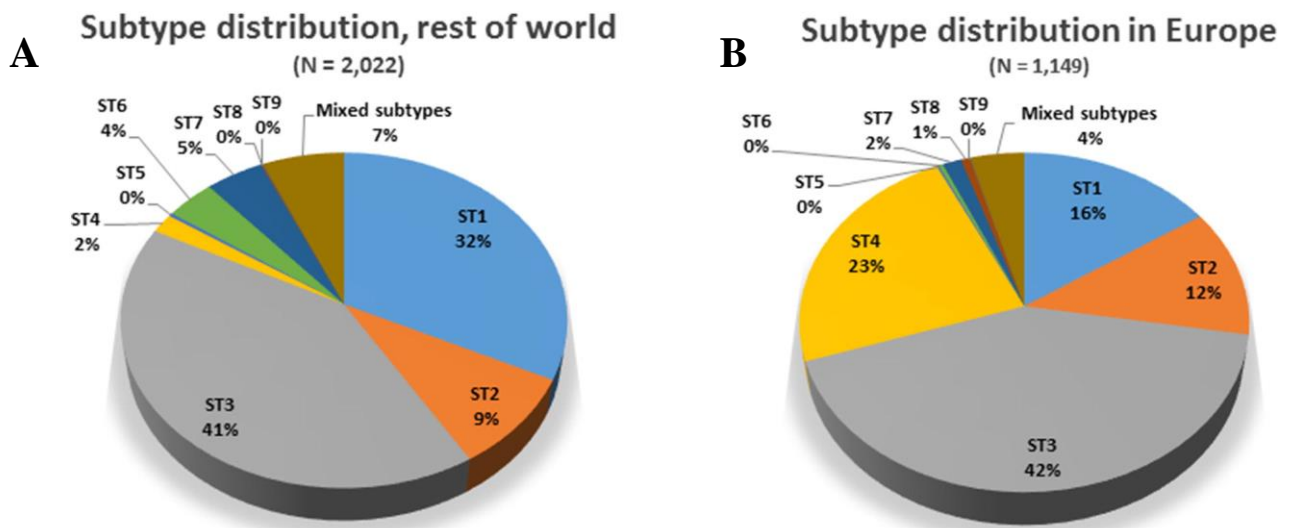
Toujours dans le cadre de cette première étude menée au Liban, 36 des 42 isolats positifs à *Blastocystis* sp. par examen microscopique ont été sous-typés permettant ainsi d'obtenir les premières données concernant la distribution des STs du parasite dans ce pays. Ainsi, les ST2 et ST3 était prédominants (33,3% chacun) suivis du ST1 (30,8%) et du ST4 en faible proportion (2,8%). Cette distribution avec une forte prédominance des ST1, ST2 et ST3 est semblable à celle observée dans les quelques pays du Moyen-Orient pour lesquels des données sont disponibles comme aux Emirats Arabes Unis (AbuOdeh et al., 2016) et au Qatar (Abu-Madi et al., 2015) où seuls les ST1, ST2 et ST3 ont été identifiés. Par contre en Iran, les données moléculaires obtenues sont extrêmement hétérogènes. En effet, dans une première étude menée à Téhéran, le ST3 est dominant suivi des ST1, ST5 et ST2 (Moosavi et al., 2012). Le ST3 est aussi dominant suivi des ST5 et ST2 dans une seconde enquête réalisée à Khorramabad (Badparva et al., 2014). Enfin, une dernière étude menée à Baghmalek montre par ordre de prévalence la présence des ST4, ST3, ST7 et ST5 ainsi que la présence d'un ST non déterminé (Khoshnood et al., 2015). En faisant une rapide synthèse de toutes ces données moléculaires cumulées au Moyen-Orient, les ST1, ST2 et ST3 sont clairement prédominants comme dans une majorité de pays à travers le monde (voir revues de Alfellani et al., 2013b; Clark et al., 2013 ; Stensvold et Clark, 2016) (**Figure A12**). Un autre ST, le ST4, est faiblement représenté dans notre étude menée au Liban. C'est aussi le cas dans tous les autres pays étudiés au Moyen-Orient où il est totalement absent à l'exception de la région de Baghmalek en Iran. Cela confirme les données synthétisées par Alfellani et al. (2013b) et Stensvold et Clark (2016) (**Figure A13**) montrant que le ST4 est prévalent uniquement en Europe. Pour expliquer cette particularité, Clark et al. (2013) ont suggéré une émergence récente de ce ST4 dans la population européenne. Cependant, les causes de l'émergence et de la diffusion du ST4 au seul continent européen restent encore inconnues.

Les analyses statistiques réalisées à partir des données moléculaires et cliniques collectées pour chaque patient dans cette première étude au Liban, ont permis d'établir une corrélation entre le ST1 et la présence de symptômes digestifs, avec une prédominance significative de ce ST chez les patients symptomatiques. Cette même corrélation ST1/troubles gastro-intestinaux avait déjà été observée en Iran (Moosavi et al., 2012). Au cours des dernières années, l'hypothèse d'une variation de virulence entre STs de *Blastocystis* sp. a été





**Figure A12:** Synthèse de la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine par continent (Alfellani et al., 2013b).



**Figure A13:** Synthèse de la distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans la population humaine non européenne (A) et européenne (B) (Stensvold et Clark, 2016 d'après les données compilées par Alfellani et al., 2013b). A noter la forte prévalence du ST4 en Europe mais pas dans les autres continents.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

avancée et a pu être partiellement confirmée à travers des études menées principalement *in vitro* même si elles ne concernent pour l'instant qu'une comparaison des ST4 et ST7 (Wu et al., 2014a, b ; Ajjampur et al., 2016). Par contre, les analyses comparatives des données moléculaires et cliniques obtenues dans le cadre de nombreuses études épidémiologiques restent très contradictoires (voir revues de Tan 2008 ; Tan et al., 2010 ; Stensvold et al., 2009b ; Scanlan et Stensvold, 2013 ; Clark et al., 2013 ; Wawrzyniak et al., 2013). Ces contradictions peuvent s'expliquer par différents biais dans ces analyses comme la méthode de détection du parasite qui est plus ou moins sensible, l'absence d'identification d'un groupe contrôle approprié et l'exclusion quasi-impossible de toutes les autres causes infectieuses ou non infectieuses pouvant être à l'origine de ces symptômes. Par exemple, les analyses bactériologiques et virologiques chez les patients ne sont en général pas réalisées car leur mise en place est beaucoup trop lourde. Aussi, cette corrélation mise en évidence dans notre étude est bien sûr à prendre avec précaution d'autant plus que les autres études en cours dans ce pays (voir perspectives ci-dessous) et incluant des cohortes de patients de la même région ne confirment pas cette association.

Afin de compléter nos données épidémiologiques, une seconde étude a été menée au Liban toujours en collaboration avec le centre AZM et visait à déterminer la prévalence de plusieurs parasites intestinaux par des méthodes moléculaires dans une population d'écoliers (**Article 3**). A côté de *Blastocystis* sp. ont aussi été recherchés *Dientamoeba fragilis*, un autre protozoaire intestinal négligé (Garcia, 2016 ; Stark et al., 2016), *Giardia duodenalis* et *Cryptosporidium* spp. Brièvement, et en se focalisant principalement sur *Blastocystis* sp., la prévalence de ce dernier parasite atteignait 63% dans cette cohorte composée de 249 enfants de 3 à 16 ans scolarisés dans deux écoles de Tripoli de niveau socio-économique différent (haut et bas niveau en fonction du quartier de la ville et du revenu moyen des parents). Ce parasite avait en outre un fort impact dans cette population puisque la différence de prévalence de *Blastocystis* sp. entre l'école de bas niveau socio-économique (66,2%) et celle de haut niveau (57,6%) n'était pas significative. C'était d'ailleurs aussi le cas pour *D. fragilis* et *Cryptosporidium* spp. De plus, la double infection par *Blastocystis* sp. et *D. fragilis* était de loin la plus fréquente ce qui confirmait des études antérieures sans que l'on puisse à ce jour expliquer cette association particulière (Calderaro et al., 2014 ; Maas et al., 2014 ; David et al., 2015). D'autre part, près de 55% des écoliers infectés par *Blastocystis* sp. étaient symptomatiques.

Cette différence de prévalence de *Blastocystis* sp. entre la population générale et les écoliers de Tripoli peut simplement s'expliquer par le fait que les enfants constituent une

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

population plus vulnérable face aux infections par des parasites intestinaux du fait essentiellement de mauvaises habitudes sanitaires et alimentaires, d'activités en extérieur dans des zones à risque et de la promiscuité entre enfants dans des structures de garde ou d'enseignement (Harhay et al., 2010). Dans plusieurs pays, la prévalence de *Blastocystis* sp. décrite chez les enfants par des méthodes microscopiques ou moléculaires est très importante comme au Brésil (86,7%) (Rebolla et al., 2016), en Argentine (68,9%) (Dib et al., 2015), au Maroc (64%) (El Fatni et al., 2014), en Colombie (57,5%) (Londono-Franco et al., 2014), au Nigeria (84%) (Poulsen et al., 2016) et puis bien sûr au Sénégal comme décrit ci-dessous (**Article 4**). Une question qui se pose alors est de connaître l'effet de l'âge sur l'infection à *Blastocystis* sp. qui ne peut être clairement défini que si les études menées chez les enfants et les adultes sont réalisées conjointement dans la même région et avec la même méthode d'identification ce qui limite considérablement la bibliographie sur le sujet. Curieusement, alors que Pipatsatitpong et al. (2015) et Rebolla et al. (2016) montrent que la prévalence du parasite chez les enfants en Thaïlande et au Brésil est plus importante que celle déterminée chez les adultes, la majorité des études contrastent avec cette observation comme celles de Amin (2006) aux Etats-Unis, Abu-Madi et al. (2010) au Qatar, Kiani et al. (2016) en Iran, Haider et al. (2012) au Pakistan, Pipatsatitpong et al. (2012) en Thaïlande, Abdulsalam et al. (2013a) en Lybie, Engsbro et al. (2014) au Danemark et Calderaro et al. (2014) en Italie sans oublier notre étude multicentrique menée en France (**Article 5** voir ci-dessous). Dans ces dernières enquêtes, la prévalence du parasite est globalement plus importante chez les adultes que chez les enfants avec, pour certaines enquêtes, un pic de prévalence pour les individus âgés de 40 à 50 ans. Vu les prévalences importantes observées dans certains pays chez les enfants, il est difficile d'imaginer des prévalences encore plus importantes chez les adultes. Notre hypothèse alors est qu'à un certain niveau d'infection en particulier dans les pays en voie de développement, l'effet âge ne se fait plus ressentir ce qui n'est pas le cas probablement dans les pays développés. Ainsi, dans ces pays, la gamme d'âge 40-50 ans pourrait aussi être celle où, par exemple, les individus voyagent le plus augmentant ainsi leur risque d'infection.

*Perspectives:* Comme indiqué précédemment, notre collaboration avec le centre AZM de Tripoli se maintient afin de compléter nos données épidémiologiques au Liban. Ainsi deux études sont en cours concernant la prévalence du parasite dans certaines cohortes. La première a déjà été mentionnée ci-dessus et fait partie d'une étude très large visant à identifier le risque de transmission du parasite à l'Homme. Dans cette enquête sont analysés

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

les échantillons de selle de patients hospitalisés à Tripoli ainsi que celles de bovins et des échantillons d'eau. La seconde, quant à elle, se focalise sur une cohorte d'environ 150 patients présentant tous des symptômes digestifs afin d'identifier les STs les plus représentés chez ces patients symptomatiques.

### **Situation de la blastocystose au Sénégal et plus globalement en Afrique**

Très curieusement, peu d'études ont été réalisées en Afrique alors que l'on peut supposer que ce continent présente un risque d'infection par *Blastocystis* sp. élevé du fait d'un péril fécal souvent omniprésent. Si on se limite aux seules études utilisant des méthodes moléculaires d'identification du parasite, une première enquête épidémiologique publiée en 2013 englobait de petites cohortes d'individus vivant au Nigéria, au Libéria et en Libye et pour lesquelles la prévalence de *Blastocystis* sp. était comprise entre 28 et 70% (Alfellani et al. 2013b). Dans la foulée, et afin de compléter les données pour ce continent, nous avons, en collaboration avec le Centre de Recherche Biomédicale Espoir pour la Santé de Saint Louis du Sénégal, déterminé la prévalence du parasite dans une population d'une centaine d'enfants vivant dans 3 villages du district de Podor au Sénégal par PCR en temps réel (**Article 4**). Dans le cadre de cette étude, une prévalence du parasite de 100% a été obtenue ce qui est à notre connaissance la première fois qu'une telle valeur est observée à travers le monde au moins pour *Blastocystis* sp. Plus récemment, deux autres études ont été menées en Tanzanie (Forsell et al., 2016) et au Nigéria (Poulsen et al., 2016) dans lesquelles les prévalences atteignent respectivement 56 et 84% confirmant ainsi l'impact majeur de ce parasite en Afrique. On note aussi que les plus fortes prévalences observées au Sénégal et au Nigéria l'ont été chez des enfants mais comme discuté précédemment, il est difficile d'y voir un lien avec l'âge dans de telles zones d'endémie et sans donnée disponible pour la population adulte. D'ailleurs, en Tanzanie, le risque d'infection par *Blastocystis* sp. est accru avec l'âge (Forsell et al., 2016).

En terme de distribution des STs du parasite dans la population d'enfants sénégalais, le ST3 était largement prédominant (49,5%) suivi des ST1 (28,2%) et ST2 (20,4%) et dans une moindre mesure, du ST4 (1,9% des isolats). Si on compare cette distribution à celle observée dans les autres pays d'Afrique pour lesquels des données sont disponibles (Hussein et al., 2008 ; Souppart et al., 2010 ; Fouad et al., 2011 ; Petrasova et al., 2011 ; Abdulsalam et al., 2013a, b, Alfellani et al., 2013b ; El Deeb et Khodeer., 2013 ; Forsell et al., 2016 ; Poulsen et al., 2016) (**Tableau A3**), on observe une répartition quasi-similaire des STs si ce n'est que le

**Tableau A3** : Distribution des STs de *Blastocystis* sp. dans différents pays africains. (Forsell et al., 2016).

Country [reference]	Subtyping method	No. of observations	Subtype <sup>a</sup>									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mixed
Egypt [17]	STS <sup>c</sup>	44	8	-	24	-	-	8	4	-	-	-
Egypt [18]	Sequencing	21	4	4	13	-	-	-	-	-	-	1 <sup>d</sup>
Egypt [19]	STS <sup>c</sup>	110	15	-	49	-	-	33	13	-	-	10 <sup>d</sup>
Egypt [20]	STS <sup>c</sup>	36	6	-	30	-	-	-	-	-	-	-
Liberia [16]	Sequencing	25	7	7	8	3	-	-	-	-	-	5 <sup>e</sup>
Libya [16]	Sequencing	38	19	3	15	-	-	-	1	-	-	-
Libya [21]	Sequencing	48	26	13	9	-	-	-	-	-	-	3 <sup>d</sup>
Nigeria [16]	Sequencing	22	10	-	9	3	-	-	-	-	-	1 <sup>e</sup>
Senegal [9]	Sequencing	93	29	21	51	2	-	-	-	-	-	8 <sup>d</sup>
Tanzania [22]	Sequencing	6	1	3	2	-	-	-	-	-	-	-
Tanzania <sup>b</sup>	Sequencing	92	36	28	27	-	-	-	1	-	-	-
Total		535	161	79	237	8	-	41	19	-	-	28

<sup>a</sup>Subtypes denoted according to a consensus denomination [12]

<sup>b</sup>Present study

<sup>c</sup>STS = sequence-tagged site primers (specific for each subtype 1–7)

<sup>d</sup>Subtypes involved in mixed infections were resolved and were added to the distribution

<sup>e</sup>Subtypes involved in mixed infections were not resolved

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

ST2 semble peu fréquent en Égypte et au Nigéria. D'autre part, le ST4 est aussi rare ou absent dans tous les pays africains ce qui confirme de nouveau l'hypothèse d'une diffusion très rare de ce ST en dehors de l'Europe (Alfellani et al., 2013b; Clark et al., 2013) (**Figures A12 et A13**).

Au Sénégal, la moitié des enfants infectés par *Blastocystis* sp. présentaient des symptômes gastro-intestinaux et le ST3 était prédominant chez les enfants symptomatiques. Le ST3 a déjà été associé à la présence de diarrhée par exemple en Libye (Abdulsalam et al., 2013b) mais ces éventuelles corrélations entre ST et symptômes sont trop sujettes à caution du fait des nombreux biais discutés précédemment. Dans notre étude, aucune corrélation n'a pu être établie entre ST et développement de troubles digestifs car les enfants étaient poly-parasités et les recherches bactériologiques et virologiques n'avaient pas été réalisées.

*Perspectives: Les données d'épidémiologie moléculaire concernant Blastocystis sp. restent trop parcellaires en Afrique d'où l'intérêt de mener des enquêtes dans des pays pour lesquels aucune information n'est encore disponible. C'est par exemple le cas dans les pays du Maghreb. Dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut Pasteur de Tunis, une première enquête épidémiologique a été réalisée par BDPEE dans la région de Tunis visant surtout à déterminer la distribution des STs du parasite. Cette étude en cours de publication montre une très large prédominance des ST1 à ST3 comme dans les autres pays africains (Am J Trop Med Hyg sous presse). Cette enquête va se poursuivre sur des cohortes plus importantes de patients afin de confirmer cette distribution et obtenir des données plus précises de prévalence. L'Afrique centrale est aussi une région de ce continent pour laquelle aucune donnée n'a encore été obtenue. Aussi, une collaboration a été initiée avec le Dr Laure Segurel du Musée National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris qui a, en sa possession, une collection d'ADNs extraits de selle d'individus camerounais (Morton et al. 2015). Cette cohorte est en cours d'analyse afin de déterminer la prévalence et la distribution des STs de Blastocystis sp. dans ce pays.*

### **Situation de la blastocystose en France et plus globalement en Europe**

Jusqu'à notre étude, les données de prévalence concernant *Blastocystis* sp. en France restaient étonnamment très limitées. Les premières données obtenues sur ce parasite indiquaient des prévalences de 3 et 6,1% après examen microscopique des selles dans deux cohortes respectivement de 2581 et 9700 individus des régions grenobloise et parisienne (Pinel et al., 1999 ; Bourée, 2007). Plus récemment, une étude réalisée au CHRU de

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Clermont-Ferrand sur une cohorte composée, de moitié, de sujets immunocompétents et de moitié, de sujets immunodéprimés atteints de cancers hématologiques montrait une prévalence globale de *Blastocystis* sp. de 14,5% en utilisant une méthode de détection par PCR en temps réel (Poirier et al., 2011). Dans cette étude, le ST4 était largement prédominant (63%) suivi du ST3 (14%), du ST7 (11%) et des ST1, ST2, et ST6 (4% pour chacun). Curieusement, une autre étude menée à Lille en 2009 et ne s'intéressant qu'à la distribution des STs de *Blastocystis* sp. mettait en évidence une nette prédominance du ST3 (53,5%) suivi du ST1 (25,6%), des ST2 et ST4 (9,3% chacun) et du ST7 (2,3%) (Souppart et al., 2009). Cette différence observée dans la distribution des STs entre ces deux études pouvait s'expliquer par des sources de contaminations différentes en fonction de la localisation géographique de ces enquêtes. Par exemple, l'Auvergne peut être considérée comme une région plus rurale que ne l'est la métropole Lilloise et de ce fait, proposer des sources d'infection par des STs différents que ceux circulant dans le Nord de la France.

Afin de compléter ces données et avoir une vision plus globale de la situation de la blastocystose dans notre pays, une étude regroupant 11 centres hospitaliers répartis sur l'ensemble du territoire français a été réalisée et englobait 788 patients (**Article 5**). C'est à notre connaissance la première enquête multicentrique menée en Europe. Par PCR en temps réel, la prévalence obtenue était, pour *Blastocystis* sp., de 18,1%, une valeur assez similaire à celle observée, en utilisant une technique moléculaire de détection, dans d'autres pays européens comme les Pays-Bas (24,2%) (Bart et al., 2013) ou encore le Danemark (23%) (Stensvold et al., 2007). Les prévalences obtenues en Italie (Masucci et al., 2011), en Espagne (Gonzalez-Moreno et al., 2011) ou au Royaume-Uni (Windsor et al., 2002, Suresh et Smith, 2004) sont plus faibles puisque comprises entre 3,9 et 7,1%. Cependant, ces valeurs sont basées sur une identification du parasite par observation microscopique directe ou culture *in vitro* des selles que l'on sait moins sensibles que les méthodes moléculaires comme discuté précédemment (voir ci-dessus et **Article 1**).

Des variations géographiques en termes de prévalence du parasite ont été observées entre les différents centres français. Ainsi le centre montrant le taux d'infection le plus élevé était celui de Lille avec une prévalence dépassant les 40% alors que ceux de Tours et de Clermont-Ferrand étaient beaucoup moins touchés avec des prévalences avoisinant les 10%. Ces variations de prévalence au sein d'un même pays ont déjà été décrites par exemple, en Chine (Wang et al., 2002 ; Li et al., 2007 a ; b), en Tanzanie (Speich et al., 2013 ; Forsell et al., 2016) ou encore en Iran comme décrit précédemment. Comme détaillé ci-dessus, la méthode d'identification du parasite, le type de cohorte étudiée et l'expérience de

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

l'observateur en cas d'identification microscopique peuvent souvent expliquer ces différences. Pour la présente enquête en France, la méthode d'identification a été standardisée et de ce fait, l'hétérogénéité des cohortes dans chaque centre peut être une explication au moins partielle de cette variation inter-centres. Cependant, ces différences peuvent aussi refléter des habitudes alimentaires ou des sources d'alimentation en eau qui sont propres à chaque région qui peut, de plus, être plus ou moins industrialisée. Cela sous-entend des sources d'infection différentes du parasite qui restent à identifier et qui pourraient expliquer ces variations.

Dans la cadre de cette étude, deux échantillonnages ont été réalisés, un premier en été et un second en hiver. Les prévalences obtenues pour *Blastocystis* sp. sont significativement différentes avec des valeurs de 23,2% en été et de 13,7% en hiver. Ces différences saisonnières ont été observées dans la quasi-totalité des centres français (9 sur les 10 centres pour lesquels des données avaient été obtenues pour les deux saisons) et dans le cadre de plusieurs études antérieures dans différents pays (Suresh et Smith, 2004 ; Amin, 2006 ; Alfellani et al., 2007 ; Haider et al., 2012 ; Boondit et al., 2014). Cette plus forte prévalence du parasite en été en France est facilement explicable par un risque plus important de transmission à travers des habitudes alimentaires particulières (consommation de légumes et de fruits crus, de glaces et de boissons fraîches avec des glaçons entre autres) couplées à des voyages fréquents dans des pays à forte prévalence du parasite ou des séjours dans des centres de vacances souvent bondés et pouvant proposer des zones d'activités aquatiques (Amin, 2006 ; Ithoi et al., 2011 ; Anuar et al., 2013).

Pour ce qui est de la distribution globale des STs observée dans notre enquête en France, elle était semblable à celle décrite pour de très nombreux pays en particulier européens (voir les revues de Alfellani et al., 2013b ; Clark et al., 2013 ; Stensvold et Clark, 2016) (**Figure A12**) avec une prédominance du ST3 (43,3%) suivis des ST1 et ST4 (20% chacun), du ST2 (12,8%) et des ST6 et ST7 (2,1% chacun). Ainsi les ST1 à ST4 représentaient près de 96% des isolats sous-typés dans cette étude. De plus, le ST4 était fréquemment retrouvé en France ce qui confirmait les études précédentes réalisées dans deux régions françaises par Poirier et al. (2011) et Souppart et al. (2009). C'est aussi le cas dans la plupart des pays européens (Stensvold et al., 2011 ; Meloni et al., 2011 ; Bart et al., 2013 ; Mattiucci et al., 2016) (**Figure A13B**) ce qui confirme l'hypothèse d'une émergence récente de ce ST sur ce continent (Clark et al., 2013). Cependant, des variations géographiques en termes de distribution des STs de *Blastocystis* sp. ont été mises en évidence entre centres français. Par exemple, le ST1 était absent à Nice et à Nîmes, le ST2 à Clermont-Ferrand, à



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Créteil, à Nîmes et à Tours et le ST4 était quant à lui absent à Créteil, à Lyon, à Nice et à Nîmes mais prédominant à Besançon et à Clermont Ferrand. Ce type de variations entre régions d'un même pays a également été observé par exemple en Egypte (Hussein et al., 2008 ; Souppart et al., 2010) ou en Thaïlande (Leelayoova et al., 2008 ; Jantermtor et al., 2013). Le nombre de patients inclus dans chaque centre français étant encore limité, on se doit de rester prudent quant à nos conclusions mais ces variations sont probablement liées à des sources de contamination différentes qu'elles soient animales ou environnementales même si la composition des cohortes par centre peut aussi représenter un élément majeur de variation.

### **Facteurs de risque de transmission de *Blastocystis* sp.**

Lors de nos études réalisées au Liban (**Article 3**) et en France (**Article 5**), des questionnaires ont été complétés pour chaque individu inclus dans les différentes études. En combinant ces informations avec nos données moléculaires, nous avons cherché à identifier, à travers des analyses statistiques, des facteurs de risque de transmission du parasite à l'Homme. Comme nous l'avons déjà souligné précédemment, nous ne pouvons que rester prudents sur ces données même si certaines d'entre elles sont concordantes entre nos études ou avec des études ultérieures.

Les informations recueillies, dans le cadre de l'étude menée chez les écoliers au Liban (**Article 3**) ont permis de montrer que le « contact avec des parents présentant des symptômes digestifs » et un « contact avec des animaux » représentaient statistiquement des facteurs de risque de transmission. Or, on sait que la transmission interhumaine du parasite doit se faire à grande échelle pour expliquer la forte prévalence du parasite dans la population (Tan, 2008 ; Wong et al., 2008 ; Lee et al., 2012b ; Clark et al., 2013 ; Boondit et al., 2014) et que le parasite a un potentiel zoonotique avéré (voir discussion ci-dessous). En revanche, le « statut socio-économique » et la « consommation d'eau non traitée » ou la « consommation de fruits et légumes crus » ne représentaient pas, curieusement, des facteurs de risque ce qui était surprenant en particulier du fait de la transmission féco-orale du parasite via la consommation d'eau ou de nourriture contaminées. D'autre part, l'infection à *Blastocystis* sp. était significativement associée au symptôme « douleurs abdominales » comme décrit dans des études ultérieures (Abdusalam et al., 2013a ; Karasartova et al., 2016).

D'après les données obtenues en France et en dehors du critère âge que nous avons déjà discuté précédemment, le critère « voyages récents » était un facteur de risque attendu si on se réfère à l'étude de Bart et al. (2013) montrant une plus forte prévalence de *Blastocystis* sp.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

chez des patients ayant récemment voyagé dans des pays tropicaux. De manière intéressante, le symptôme « douleurs intestinales » était là encore associé à l'infection à *Blastocystis* sp. comme mentionné ci-dessus pour l'étude sur les écoliers au Liban. Concernant l'immunodépression, elle a été, dans plusieurs études, identifiée comme un facteur de risque de transmission confirmé puisque la prévalence du parasite est généralement plus élevée chez les individus immunodéprimés que chez les individus immunocompétents (Kurniawan et al., 2009 ; Alemu et al., 2011 ; Poirier et al., 2011). Or, dans l'étude française, les patients immunocompétents étaient plus infectés par *Blastocystis* sp. que ne l'étaient les patients immunodéprimés alors que ce parasite est considéré comme un opportuniste (Marcos et Gotuzzo, 2013). Cette observation inattendue pourrait d'abord s'expliquer par le fait que, dans notre étude, les patients immunodéprimés avaient beaucoup moins voyagé que les immunocompétents ce qui limitait les risques d'infection. De plus, le suivi des patients immunodéprimés est généralement rigoureux et ces derniers sont souvent contraints à suivre une alimentation contrôlée et des antibiothérapies fréquentes. Ces paramètres peuvent entraîner de fait un biais dans nos résultats en termes de prévalence du parasite dans ce groupe particulier d'individus.

### **Prévalence de *Blastocystis* sp. dans différents groupes d'animaux et évaluation de son pouvoir zoonotique**

Un autre facteur de risque majeur de transmission de *Blastocystis* sp. à l'Homme est en lien avec le potentiel zoonotique du parasite. En effet, *Blastocystis* sp. infecte un grand nombre de groupes d'animaux (Boreham et Stenzel, 1993 ; Stenzel et Boreham, 1996) dont bon nombre peuvent être en contact avec l'Homme comme par exemple les animaux de compagnie, le bétail ou plus globalement les animaux de ferme et représenter ainsi des sources potentielles de transmission zoonotique. Comme plusieurs des 17 STs identifiés jusqu'à présent sont communs à l'Homme et à l'animal (Alfellani et al., 2013a, b), il a été proposé qu'une certaine proportion des infections humaines résulte d'une transmission zoonotique. Ainsi 9 puis récemment 10 (Ramirez et al., 2016) de ces 17 STs ont été trouvés chez l'Homme avec des fréquences variables (Alfellani et al., 2013b ; Ramirez et al., 2016) (**Figure A12**). Brièvement, les ST1 à ST4 représentent plus de 90% des isolats sous-typés chez l'Homme. Même si certains de ces STs peuvent être trouvés chez les animaux, leur forte prévalence dans la population humaine ne peut s'expliquer que par une large transmission interhumaine. Concernant le ST9, il n'avait pour l'instant été trouvé que chez l'Homme et

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

qu'en de rares occasions (3 individus infectés à ce jour au Danemark et au Japon) (Alfellani et al., 2013b). Or, en analysant récemment les bases de données, les séquences de 2 isolats de ST9 identifiés chez des poulets en Malaisie ont été mis en ligne dans la GenBank (Numéros d'accès : KX234596 et KX234623) (Abdullah et al. non publié). Ces 10 STs présentent donc une spécificité d'hôte variable classée de faible à modérée en colonisant l'Homme et différents groupes d'animaux. Les ST5, ST6, ST7, ST8, ST9 et ST12 qui sont des STs considérés comme des STs animaux seraient ainsi chez l'Homme très probablement le résultat d'une transmission zoonotique. On note d'ailleurs sur la **Figure A13** qui reprend des données collectées en 2013 par Alfellani et al. (2013b) que les seuls ST6 et ST7 considérés comme des « STs aviaires » (Noël et al., 2005 ; Stensvold et al., 2009a ; Alfellani et al., 2013b) représentent environ 3% des isolats humains en Europe et environ 9% pour le reste du globe. Si ce pourcentage est ramené au nombre d'individus infectés par le parasite à travers le monde, cela montre l'impact plus que significatif de ce type de transmission en particulier dans les pays en voie de développement ou les régions plus rurales.

Pour essayer de clarifier la contribution de chaque groupe d'animaux à ce type de transmission, encore faut-il avoir des données concernant la prévalence et la distribution des STs dans les groupes d'animaux concernés. Pour des raisons évidentes, il est nettement plus facile d'obtenir des échantillons de selle pour des animaux hébergés dans des parcs zoologiques ou dans des élevages que pour des animaux sauvages. De plus, les zoos de taille importante permettent l'analyse d'une très grande variété de groupes taxonomiques. Dans cette optique, il n'est donc pas surprenant que la majorité des enquêtes réalisées jusqu'à présent l'aient été dans des parcs zoologiques (Parkar et al., 2007, 2010 ; Stensvold et al., 2009a ; Alfellani et al., 2013a, c ; Roberts et al., 2013), des parcs nationaux (Petrasova et al., 2011) ou des fermes d'élevage (Navarro et al., 2008 ; Fayer et al., 2012 ; Wang et al., 2014). Cependant, ces études portaient sur un nombre encore assez limité de groupes d'animaux et une meilleure connaissance de l'épidémiologie de *Blastocystis* sp. nécessitait de renforcer et d'élargir cet échantillonnage. Aussi, nous avons décidé d'analyser la présence de ce parasite par PCR en temps réel dans un grand nombre de groupes d'animaux hébergés dans les zoos de Lille et La Palmyre en Charente-Maritime (**Article 6**).

Au total, pas moins de 307 échantillons de selle correspondant à 161 espèces animales ont été analysés pour ces deux zoos et couvraient les primates, les carnivores, les artiodactyles, les perissodactyles, les Proboscidea, les rongeurs, les chiroptères, les oiseaux, les reptiles (tortues, crocodiles et serpents) et les insectes. C'est à notre connaissance la plus large étude jamais réalisée dans le monde concernant *Blastocystis* sp. chez les animaux et la

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

première menée en France. Globalement, 32,2% des échantillons analysés et 37,9% des espèces étudiées se sont avérés positifs pour le parasite ce qui témoigne de l'impact de *Blastocystis* sp. même chez des animaux de zoos hébergés dans des conditions optimales. Cette prévalence était cependant très variable d'un groupe d'animaux à l'autre. Parmi les groupes les plus représentés dans notre enquête, certains étaient très infectés comme les primates (60,3% des échantillons et 59% des espèces) et les artiodactyles (52,5% des échantillons et 73,3% des espèces) comme cela avait déjà été montré dans des études ultérieures menées en particulier dans plusieurs zoos à travers le monde (Abe et al., 2002 ; Stensvold et al., 2009a ; Parkar et al., 2010 ; Alfellani et al., 2013a ; Roberts et al., 2013). Par contre, ce n'était pas le cas des carnivores (7,5% des échantillons et 18,2% des espèces) comme décrit précédemment (Abe et al., 2002 ; Alfellani et al., 2013a) et des oiseaux (8,6% des échantillons et 8,9% des espèces). Dans le cas de ce dernier groupe, ces données contrastaient fortement avec celles observées dans des zoos japonais où la prévalence du parasite était comprise entre 56 et 100% des espèces testées (Yamada et al., 1987 ; Abe et al., 2002). Des conditions d'hygiène sans doute beaucoup plus draconiennes de nos jours et un hébergement individuel de la majorité des espèces d'oiseaux à Lille et La Palmyre pourraient expliquer ces différences de prévalence observées entre les zoos français et japonais.

A partir de tous ces échantillons positifs, 111 isolats de *Blastocystis* sp. ont été sous-typés et la distribution des STs du parasite a été analysée pour chaque groupe d'animaux. Nos données ont ensuite été compilées avec toutes celles disponibles à ce jour dans les bases de données pour ces animaux (synthétisées en partie par Alfellani et al., 2013a) et la nouvelle distribution des STs a été comparée à celle observée globalement dans la population humaine (Alfellani et al., 2013b). Pour qu'un groupe d'animaux puisse représenter un réel risque pour l'Homme, nous nous sommes basés sur 4 critères qui nous semblent essentiels : i) une prévalence importante du parasite dans le groupe d'animaux considéré ; ii) un ou des STs dominants (et de préférence spécifiques) dans ce groupe d'animaux, ce dernier étant alors un hôte naturel du parasite ; iii) une parfaite identité de séquence entre isolats de ce groupe d'animaux et isolats humains ; et iv) un contact possible et fréquent entre ce groupe d'animaux et l'Homme.

Si on se focalise sur les groupes les plus étudiés, les primates sont essentiellement infectés par les ST1 à ST3. Ce sont aussi les trois STs les plus représentés chez l'Homme ce qui peut être en lien avec la proximité évolutive de ces deux hôtes. De plus, ces trois STs majeurs sont aussi ceux retrouvés chez les primates à l'état sauvage (Alfellani et al., 2013c) indiquant donc que ces STs sont spécifiques de ce groupe d'animaux qui est très infecté par le

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

parasite comme décrit ci-dessus. En outre, près de 70% des séquences obtenues dans notre étude pour les primates montrent 100% d'identité avec celles d'isolats humains. De ce fait, les primates remplissent nos conditions et pourraient représenter une source de transmission zoonotique potentielle. Par contre, l'impact de cette transmission est difficilement quantifiable puisque ces STs sont communs à l'Homme et aux singes. De ce fait, le sens de la transmission du parasite reste très difficile à déterminer. D'autre part, il est évident que le risque d'infection par un singe est plus que limité si ce n'est dans des zoos ou des parcs nationaux. Ainsi, des infections fréquentes chez les soigneurs des primates dans des zoos australien et anglais ont été démontrées (Parkar et al., 2007 ; Stensvold et al., 2009a) ainsi qu'une transmission entre des singes rhésus et des enfants vivant dans la même région au Népal (Yoshikawa et al., 2009).

Pour le groupe des carnivores qui est d'un grand intérêt puisqu'il englobe la plupart des animaux de compagnie, le peu d'isolats sous-typés appartenaient aux ST1, ST2 et ST3 fréquents chez l'Homme comme chez d'autres groupes d'animaux et donc peu spécifiques de ce groupe d'hôtes. Globalement, la prévalence du parasite dans ce groupe d'animaux et en particulier dans la population canine est extrêmement limitée d'après plusieurs études récentes (Wang et al., 2013 ; Ruaux et Stang., 2014 ; David et al., 2015 ; Osman et al., 2015 ; Belleza et al., 2016). De plus, les STs identifiés chez ces animaux n'étant pas spécifiques à ce groupe, toutes ces données suggèrent que les chiens et plus généralement les carnivores ne seraient pas a priori des hôtes naturels de *Blastocystis* sp. Ils seraient ainsi infectés de manière accidentelle et transitoire par contact avec des matières fécales humaines ou animales dans leur environnement (Wang et al., 2013 ; Osman et al., 2015).

Concernant les artiodactyles, seuls les Bovidae ont été analysés dans notre étude avec une majorité d'entre eux infectés par les ST10 et ST14. Or, ces deux STs sont aussi prédominants chez les bovins d'élevages (Stensvold et al., 2009a ; Santin et al., 2011 ; Fayer et al., 2012 ; Alfellani et al., 2013a) suggérant donc que ces animaux sont des hôtes naturels de ces deux STs. Cependant, malgré l'exposition fréquente de nombreux individus comme les éleveurs aux bovins, ces deux STs n'ont jamais encore été identifiés chez l'Homme indiquant que ces animaux ne représenteraient donc pas une source significative de transmission zoonotique. Au sein des artiodactyles, des données moléculaires et de prévalence sont aussi disponibles dans la littérature pour les cochons et ce groupe d'animaux est fréquemment infecté par les ST1 et ST5 (Navarro et al., 2008 ; Stensvold et al., 2009a ; Wang et al., 2014 ; Yoshikawa et al., 2016b). Les cochons seraient donc des hôtes naturels de ces deux STs. De plus, le potentiel zoonotique de ces animaux a été clairement mis en évidence récemment par

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Wang et al. (2014) dans un élevage intensif de cochons où le personnel de la structure était anormalement infecté avec une forte prévalence par des isolats de ST5. Les isolats de ST5 humains présentaient en outre une identité de séquence parfaite avec celle des isolats de cochons.

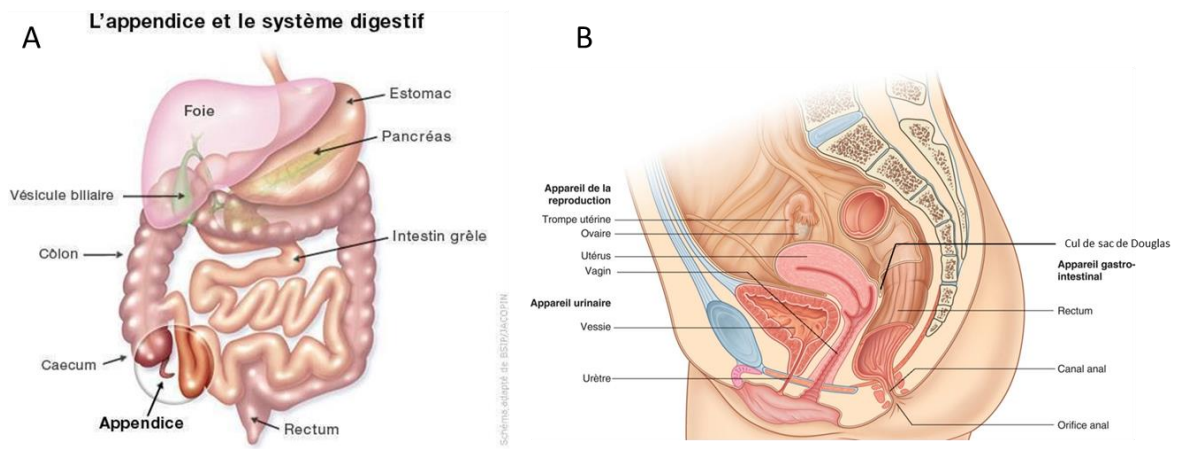
Pour ce qui est finalement des oiseaux, on sait qu'ils sont très fréquemment infectés par *Blastocystis* sp. dans les fermes et les élevages et en particulier ceux de poulets et de canards (Lee et Stenzel., 1999 ; Bergamo do Bomfim et al., 2013 ; Yoshikawa et al., 2016b) ce qui représente naturellement un risque de transmission zoonotique potentiel. Cela n'est semble-t-il pas le cas des oiseaux dans les zoos français puisque la prévalence du parasite y est très faible pour les raisons probables énoncées précédemment. De plus, dans ces zoos, les STs identifiés n'étaient pas des STs aviaires (ST6 et ST7) généralement mis en évidence dans ce groupe d'animaux (Alfellani et al., 2013a) suggérant que d'autres STs peuvent occasionnellement infecter ces animaux. Les oiseaux seraient donc des hôtes naturels des ST6 et ST7 et on sait que des isolats de ST6 et ST7 d'oiseaux présentent 100% d'identité avec des isolats humains (Noël et al., 2005). Si on rajoute à ces observations un contact fréquent de différentes catégories de personnel avec ces animaux, tout indique que les infections à ST6 et ST7 chez l'Homme seraient zoonotiques. Très récemment, Koltas et Eroglu (2016) ont montré la présence d'individus infectés par les ST6 et les ST7 dans une région rurale de Turquie où se trouvent des élevages de poulets alors qu'aucune infection par ces deux STs n'était observée dans une région urbaine voisine. Cependant, il manque toujours pour confirmer définitivement cette transmission zoonotique une analyse moléculaire comparative d'isolats d'oiseaux et d'humains vivant en contact ou à proximité.

*Perspectives* : Dans le cadre d'un Partenariat Hubert Curien (PHC) CEDRE France-Liban que l'équipe BDPEE coordonne, un projet vise entre autre à déterminer la prévalence de *Blastocystis* sp. chez les poulets de plusieurs abattoirs du Nord-Liban et de Beyrouth mais aussi chez le personnel de ces abattoirs et dans une population contrôle n'étant pas en contact avec ces animaux. Cette étude permettra de déterminer, pour la première fois, la prévalence du parasite dans la filière aviaire qui a un impact économique majeur au Liban tout en confirmant le potentiel zoonotique de ces animaux à travers l'analyse moléculaire comparative des isolats animaux et humains des différentes cohortes. En parallèle, toujours au Liban et comme déjà mentionné précédemment, une étude est en cours afin d'analyser la circulation et le risque zoonotique du parasite dans une région géographique limitée du Nord-Liban en analysant des échantillons humains, animaux (bovins) et environnementaux

(eau de consommation). Enfin, dans le cadre du projet ABC FISH financé par la région Hauts-de-France et coordonné par BDPEE, *Blastocystis* sp. a été recherché et identifié pour la première fois chez les poissons et les mammifères marins. Cette étude qui est sur le point d'être finalisée permettra de déterminer la prévalence de ce parasite chez ces hôtes et en particulier chez les poissons qui peuvent représenter une source de contamination potentielle pour l'Homme à travers leur manipulation et leur consommation.

### **Analyse du pouvoir pathogène et invasif de *Blastocystis* sp. à travers l'étude d'un cas clinique**

Un modèle hypothétique de la physiopathologie de *Blastocystis* sp. a été récemment proposé en se basant sur plusieurs études pour la plupart *in vitro* (Ajjampur et Tan, 2016). Cependant, malgré l'accumulation de toutes ces données, le lien entre une pathologie intestinale et l'infection par *Blastocystis* sp. reste encore à clarifier et dans ce sens, l'analyse de cas cliniques est donc d'un intérêt crucial. Dans le cadre de notre étude (**Article 7**), une jeune patiente de 9 ans de retour d'un séjour au Maroc dans sa famille pendant les vacances s'est présentée au CHRU de Lille avec de la fièvre, des diarrhées et des douleurs abdominales importantes. L'échographie abdominale réalisée chez cette patiente montrait une appendicite purulente. L'intérêt pour nous est venu du fait que *Blastocystis* sp. était le seul micro-organisme mis en évidence lors de l'examen parasitologique des selles et qu'aucun autre agent infectieux tels que les bactéries *Salmonella* spp., *Shigella* spp. et *Campylobacter* spp. ou les adenovirus ou rotavirus fut identifié. L'analyse moléculaire des différents prélèvements qui nous sont parvenus (liquide péritonéal, appendice, exsudat du cul-de-sac de Douglas, selles) (**Figure A14**) a permis d'identifier *Blastocystis* sp. ST2 dans tous ces prélèvements avec en plus la présence du ST3 dans les selles. Sur un plan histologique, le parasite a été détecté dans la lumière et le chorion de l'appendice confirmant ainsi le potentiel invasif de *Blastocystis* sp. L'origine de cette appendicite était probablement due à une obstruction mécanique comme cela est généralement le cas. Cependant, cette obstruction a certainement entraîné une dissémination de *Blastocystis* sp. dans l'exsudat du cul de sac de Douglas et l'appendice et une inflammation aigüe de l'appendice à laquelle le parasite était associé. Le traitement de la patiente à base de tinidazole (dérivé du métronidazole) a entraîné la disparition totale des symptômes et du parasite dans les selles confirmant ainsi le pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp.



**Figure A14:** Localisation **(A)** de l'appendice au sein de l'appareil digestif (<http://jeanprovencher.com/2015/02/08/appendicite-vous-dites/>) et **(B)** du cul de sac de Douglas (<http://urofrance.org>).



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Quelques études ont rapporté des cas d'appendicites ou de colites associées à l'infection par *Blastocystis* sp. (Andiran et al., 2006 ; Deniz et al., 2007 ; Lucia et al., 2007 ; Thanikachalam et al., 2008 ; Tai et al., 2011 ; Lintong et al., 2012). Néanmoins, cette étude est la première à confirmer la présence du parasite par des méthodes moléculaires et nous questionne sur l'impact de *Blastocystis* sp. dans ce type de pathologies. De plus, en regroupant l'ensemble des informations liées à ce cas clinique, il a été observé que 26 autres membres de la famille de cette jeune patiente avaient souffert de diarrhées et de vomissements suite à un repas familial pris en commun suggérant une épidémie de blastocystose d'origine hydrique. Ces résultats montrent l'importance de l'analyse de cas clinique puisque à l'heure actuelle, seuls 2 épisodes avérés d'épidémie de blastocystose d'origine hydrique ont été relatés (Guglielmetti et al., 1989 ; Wu et al., 2000).

*Perspectives* : De tels cas cliniques relatant des pathologies intestinales sans autre entéropathogène que *Blastocystis* sp. représentent des avancées significatives quant à la clarification de la physiopathologie du parasite. La collaboration avec les praticiens du CHRU de Lille (Dr E Fréalle et Dr E Dutoit) très sensibilisés à cette parasitose se poursuit et les membres de BDPEE se tiennent prêts à analyser de nouveaux cas impliquant *Blastocystis* sp. afin que ce parasite soit pleinement pris en compte dans ce type de pathologies intestinales.

### ***Blastocystis* sp. et microbiote intestinal**

Depuis quelques années, l'étude du microbiote intestinal connaît un essor considérable. En effet, l'altération dans la composition des communautés microbiennes appelée aussi dysbiose est impliquée dans différentes pathologies liées à des troubles de l'immunité ou des désordres métaboliques (De Vos et De Vos, 2012 ; Le Chatelier et al., 2013). De plus, divers pathogènes entériques sont aussi capables d'induire de fortes perturbations du microbiote intestinal avec les symptômes qui en découlent (Raetz et al., 2013 ; Pham et Lawley, 2014).

Comme nous avons pu l'indiquer à plusieurs reprises dans ce mémoire, le pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp. reste encore controversé même si les données s'accumulent en faveur de son pouvoir pathogène (Ajjampur et Tan, 2016). Aussi la question se pose de savoir si l'infection par *Blastocystis* sp. est associée ou non à un microbiote particulier et entraîne ou non une dysbiose. Afin d'essayer de répondre à ces interrogations, une première étude de Nourrisson et al. (2014) dans laquelle j'ai eu une participation mineure (**Annexe VI**) a d'abord recherché *Blastocystis* sp. dans une cohorte composée de sujets contrôles sans

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

pathologie digestive et de patients atteints du SII. La prévalence du parasite était significativement plus forte chez les patients SII mais uniquement chez les mâles suggérant que *Blastocystis* sp. pourrait avoir un rôle dans la physiopathologie du SII. Comme le microbiote intestinal des patients SII est connu pour être significativement différent de celui de personnes saines (Collins, 2014), nos collègues clermontois ont alors cherché à connaître l'impact de la colonisation du parasite dans cette cohorte de patients atteints ou non de SII en réalisant une quantification par PCR quantitative (qPCR) de 8 groupes bactériens majeurs du microbiote intestinal (*Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Desulfovibrio*, *Clostridium coccoïdes*, *Clostridium leptum* et *Faecalibacterium prausnitzii*). Ainsi, lorsque *Blastocystis* sp. était présent, les *Bifidobacterium* étaient diminués chez les mâles présentant un SII et chez les mâles contrôles alors que ces bactéries sont largement utilisées comme probiotiques pour leurs propriétés anti-cancéreuses et immunostimulatrices (Russell et al., 2011). De plus, chez les mâles contrôles infectés par *Blastocystis* sp., on observait aussi une réduction de *F. prausnitzii*, une bactérie qui peut avoir des effets anti-inflammatoires (Sokol et al., 2008). Même si l'approche utilisée et le nombre limité de patients analysés ne permettait pas de tirer des conclusions définitives, cette étude montrait cependant la diminution de bactéries considérées comme protectrices chez les patients mâles SSI et les mâles contrôles infectés par *Blastocystis* sp. suggérant un rôle du parasite dans cette modification de la composition du microbiote de ces individus.

Trois autres études plus récentes ont comparé les abondances relatives de certains groupes bactériens représentatifs du microbiote intestinal chez des patients infectés ou non par *Blastocystis* sp. Dans les deux premières études (Andersen et al., 2015, 2016), les auteurs ont montré que les personnes les plus parasitées étaient celles ayant des entérotypes *Prevotella* et *Ruminococcus* et non l'entérotype *Bacteroides*. Or, l'entérotype *Bacteroides* est caractérisé par une plus faible diversité microbienne. Dans la seconde étude menée par Iebba et al. (2016), leurs conclusions allaient dans le même sens puisqu'ils montraient qu'une infection par *Blastocystis* sp. ou par *Entamoeba* spp. n'était pas liée à une condition dysbiotique au contraire d'une infection par *G. duodenalis*.

Les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux préliminaires n'avaient donc pas permis d'associer la présence de *Blastocystis* sp. à une dysbiose intestinale. Il était alors clair qu'une étude utilisant des techniques à haut débit permettait d'obtenir une vue plus globale des modifications de ces communautés bactériennes en présence ou non du parasite et de confirmer ou infirmer les premières hypothèses. En collaboration avec la société Gènes Diffusion, une étude de métagénomique ciblant une région de l'ADNr 16S a été réalisée pour

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

une cohorte englobant 48 patients colonisés par *Blastocystis* sp. et 48 patients contrôles non colonisés (**Article 8**). L'ensemble de nos données montre sans discussion possible une augmentation de la diversité bactérienne chez les patients positifs à *Blastocystis* sp. ce qui va dans le sens des deux études citées précédemment. De plus, elles suggèrent que la présence du parasite ne serait pas associée au microbiote généralement observé chez les personnes atteintes d'une pathologie intestinale mais plutôt au microbiote d'un intestin sain et que *Blastocystis* sp. a sans doute besoin d'une diversité importante du microbiote intestinal pour s'installer dans le côlon de son hôte.

Les cas d'augmentation avérée de la diversité microbienne intestinale lors d'infections parasitaires sont très restreints dans la littérature et concernaient, jusqu'à présent, les helminthes. En 2012, une étude réalisée chez des singes présentant des diarrhées chroniques a montré que l'administration du ver *Trichuris trichiura* aux animaux entraînait une amélioration de leur état clinique et permettait de restaurer la diversité de leurs communautés microbiennes intestinales (Broadhurst et al., 2012). Plus récemment, l'analyse du microbiote intestinal d'individus malaysiens colonisés ou non par des helminthes a également permis de mettre en évidence une diversité bactérienne plus riche chez les patients colonisés par ces nématodes (Lee et al., 2014). Enfin, et pour confirmer les derniers travaux de Iebba et al. (2016), l'étude du microbiote intestinal d'individus camerounais a montré que, comme pour *Blastocystis* sp., la diversité bactérienne était plus importante chez les individus colonisés par *Entamoeba* spp. (Morton et al., 2015).

*Perspectives*: Dans le cadre de la collaboration initiée avec le Dr Laure Segurel du MNHN de Paris, nous aurons rapidement à notre disposition les données du microbiote bactérien intestinal de patients camerounais infectés ou non par *Blastocystis* sp. (Morton et al. 2015) qui pourront être comparées à celles que nous avons obtenues. De plus, nous souhaitons poursuivre l'étude de l'impact de la colonisation par *Blastocystis* sp. sur le microbiote intestinal dans le modèle animal qui sera développé dans l'équipe (voir ci-dessous).

### **Développement d'un modèle animal de blastocystose**

Pour pouvoir clarifier la physiopathologie et la dynamique d'infection de *Blastocystis* sp., il devient maintenant urgent de pouvoir développer un modèle animal reproductible de blastocystose (Ajjampur et Tan, 2016). Une partie de ma thèse s'est donc focalisée sur cette problématique mais les résultats obtenus n'ont pas été concluants pour des raisons que nous avons essayé de déterminer. En reprenant les données les plus fiables disponibles dans la

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

littérature, nous avons d'abord fixé la dose de parasites à inoculer aux animaux et son mode d'inoculation. Cette dose a été fixée à  $10^7$  car la plus couramment utilisée (Moe et al., 1997 ; Yoshikawa et al., 2004; Hussein et al., 2008 ; Elwakil et Hewedi, 2010) et inoculée par gavage gastrique (voie orale). Dans un second temps, nous devons choisir le ST de l'isolat à inoculer à nos animaux tout en sachant que ce parasite a généralement une faible spécificité d'hôte. Comme montré par Alfellani et al. (2013a) puis dans le cadre de notre enquête dans des zoos français (**Article 6**), le ST4 serait fréquemment présent chez les rongeurs d'où le choix porté sur ce ST et l'isolat WR1 pour notre première expérimentation animale avec des rats Wistar. Ces jeunes rats ont été traités à la dexaméthasone pour induire une immunodépression et faciliter une éventuelle infection. Après 6 semaines d'infection puis euthanasie des rats, des formes vacuolaires anormales pouvant correspondre aux parasites ont été mises en évidence au niveau du duodénum, du caecum et du côlon des animaux en histologie et dans une fraction côlon plus caecum par PCR. Quelques études avaient déjà montré des infiltrations du parasite entre les cellules épithéliales intestinales (Elwakil et Hewedi, 2010 ; Abdel-Hafeez et al., 2016) sans que cela soit confirmé puisqu'aucune méthode d'identification spécifique du parasite dans les tissus n'a encore été mise au point. De plus, le parasite n'a pas été détecté dans les selles des animaux tout au long de l'infection laissant suggérer un portage possible du parasite avec un faible taux d'infection (portage chronique) sans développement de signes cliniques.

A la vue de ces premiers résultats, la poursuite de nos expérimentations animales devaient passer par l'utilisation d'autres isolats. Wu et al. (2014a) avaient montré que l'isolat WR1 de ST4 que nous utilisons n'adhérait pas sur une monocouche de cellules Caco-2 et que l'isolat B de ST7 disponible au laboratoire entraînait une altération des jonctions serrées suggérant ainsi une virulence accrue de ce dernier isolat. Aussi, cet isolat de ST7 a été utilisé dans une seconde expérimentation à la même dose que l'isolat précédent de ST4 et en gavant par voie orale des rats Nude immunodéprimés mis sous dexaméthasone pour accentuer encore leur immunodépression. Malheureusement, les analyses histologiques et moléculaires réalisées lors de l'infection des rats par cet isolat n'ont pas permis de mettre en évidence le parasite et aucune modification histologique des tissus n'a été observée chez les animaux infectés.

La réussite de l'infection pouvant être ST-dépendante chez le rat, une troisième expérimentation a donc été réalisée avec l'isolat 17c82b de ST8. Cependant, des résultats similaires à ceux obtenus pour l'isolat B de ST7 ont été obtenus chez des rats Nude sous dexaméthasone infectés par voie orale.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au vu des résultats obtenus lors de ces différentes expérimentations, le mode d'administration du parasite par voie orale pouvait représenter un facteur limitant du fait de la fragilité de la forme vacuolaire qui pourrait être détruite en ne supportant pas le pH très acide de l'estomac empêchant ainsi tout développement du parasite au niveau du côlon. Pour pallier à cela, nous avons soumis une nouvelle demande d'autorisation de projet afin de réaliser une micro-chirurgie et une inoculation par voie intra-caecale de rats Nude sous dexaméthasone. Ainsi, les formes vacuolaires de l'isolat B de ST7 sensé être virulent ont été administrées directement par injection dans le caecum de l'animal. Cependant, comme pour les deux expérimentations précédentes, aucun parasite n'a été détecté dans les selles et les tissus des animaux après plusieurs semaines d'infection. Très récemment, Ajjampur et al. (2016) ont eux aussi tenté, sans succès, une infection par voie intra-caecale de souris C57/Bl6 par deux isolats de ST7 dont le B. Par contre, ces mêmes souris chez lesquelles une colite avait été préalablement induite par du DSS développaient des diarrhées après inoculation du parasite par voie intra-caecale. Utiliser des modèles de colite (ou d'autres pathologies intestinales) pourrait ainsi permettre d'infecter expérimentalement les animaux mais limitera de fait l'étude de la physiopathologie du parasite puisque son impact en termes en particulier d'inflammation sera potentiellement masqué par celui de la pathologie induite. Le développement de notre modèle animal a donc été logiquement suspendu afin d'envisager de nouvelles solutions qui passent, très probablement, par l'utilisation de formes kystiques pour l'infection. En effet, sachant que la forme kystique est reconnue comme étant la forme infectieuse (Suresh et al., 2005), cette dernière serait probablement indispensable pour infecter les animaux mais seules les formes vacuolaires sont maintenues en culture. Il est donc nécessaire de pouvoir induire le passage *in vitro* de la forme vacuolaire vers la forme kystique afin de pouvoir réaliser de nouvelles infections des animaux par gavage oral. Dans la littérature, le passage *in vitro* de la forme vacuolaire vers la forme kystique a été mis en évidence (Suresh et al., 1993) mais malgré plusieurs essais, cet enkystement du parasite n'a pas été observé dans notre laboratoire.

*Perspectives : Ce projet va se poursuivre dans l'équipe dès janvier prochain via un stage de Master 2 ayant pour but de mettre au point, dans un premier temps, un protocole de passage in vitro de la forme vacuolaire à la forme kystique de Blastocystis sp. Cette mise au point représente la base de tout développement ultérieur d'un modèle animal de blastocystose permettant de clarifier la physiopathologie du parasite mais aussi de pouvoir compléter nos travaux sur l'influence de la colonisation par Blastocystis sp. sur le microbiote intestinal.*

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ainsi, plusieurs STs seront cultivés en présence de différentes concentrations de drogues induisant par exemple un choc oxydatif afin de fixer une dose de drogue stressant le parasite pour induire son passage sous forme kystique tout en maintenant sa viabilité. En parallèle, plusieurs modifications de la composition du milieu de culture seront aussi testées (sérum, additifs nutritionnels, pH ...) afin d'induire ce passage. La validité de ce passage sous forme kystique sera testée de deux manières. La première est l'observation par microscopie électronique des populations de kystes obtenues en se basant sur les données publiées dans la littérature concernant l'ultrastructure des kystes. La seconde sera de remettre en culture ces populations de kystes dans du milieu normal afin de s'assurer de leur retour à la forme vacuolaire et donc de leur viabilité. Une fois ce passage entre les deux formes mis au point, le processus d'enkystement sera suivi par des approches de transcriptomique et de protéomique. Les populations vacuolaires et kystiques seront comparées afin d'identifier les voies métaboliques spécifiques de chacune des formes. Parmi les drogues testées seront utilisées des molécules oxydantes afin d'analyser plus spécifiquement le système enzymatique antioxydant mis en jeu par le parasite. Ce système a en effet un rôle majeur en luttant contre les radicaux libres produits par les cellules effectrices de l'hôte lors de l'infection. Les fractions de kystes ainsi obtenues pourront alors être utilisées dans de nouvelles expérimentations animales. Enfin, l'utilisation d'explants intestinaux de souris (modèle *ex vivo*) mis en contact avec les parasites, initiée par Ajjampur et al. (2016) pour *Blastocystis sp.* et développée depuis un certain temps dans l'équipe BDPEE pour étudier l'infection par *Cryptosporidium spp.*, pourrait aussi être une approche complémentaire à condition que le milieu utilisé puisse permettre de maintenir à la fois l'explant et le parasite pour de longues périodes.

### **Apports de la génomique comparative**

Brièvement, les approches de génomique comparative permettent d'identifier les similarités et les différences entre génomes tant au niveau de leur contenu génique, de leur structure que de leur organisation. Une des raisons pour lesquelles la pathogénicité de *Blastocystis sp.* peut encore être discutée est la fréquence importante du portage asymptomatique du parasite. Ceci pourrait être lié en particulier à l'existence de STs pouvant être plus ou moins pathogènes (Wu et al., 2014a, b ; Ajjampur et al., 2016). Ainsi, une étude coordonnée par le laboratoire LMGE de Clermont Ferrand, et à laquelle notre équipe avait participé, avait permis d'obtenir le génome annoté d'un isolat de *Blastocystis sp.* ST7

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

(Denoed et al., 2011). Par la suite, le génome d'un isolat de ST4 a été séquencé durant ma thèse avec la technique Illumina (HiSeq 2000). L'annotation de cet isolat de ST4 a permis d'obtenir les principales caractéristiques de ce génome et de le comparer avec celui de ST7 (**Article 9**). La taille de ce nouveau génome (12,91 Mbp) était bien inférieure à celle observée pour le génome de ST7 (18,8 Mbp) ce qui pouvait s'expliquer en partie sans doute par un nombre beaucoup plus réduit de gènes dupliqués dans le génome de ST4. De plus, près de 30% des gènes de l'isolat de ST4 n'avaient pas d'orthologues avec l'isolat de ST7. C'était un point intéressant puisque nous nous focalisons sur les différences entre ces génomes. De manière intéressante, 8 groupes d'orthologues correspondaient à des protéines potentiellement liées à l'adhésion cellulaire, avec la présence de domaines de type cadhérine, lectine ou immunoglobuline. Or on sait que le ST7 est capable d'adhérer *in vitro* sur une monocouche de cellules Caco-2 (Wu et al., 2014a) entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale par dégradation des jonctions serrées de l'épithélium ce qui n'est pas le cas du ST4. En parallèle, en recherchant les seuls facteurs de virulence identifiés jusqu'à présent chez *Blastocystis* sp. en l'occurrence les peptidases (Mirza et Tan, 2009 ; Puthia et al., 2005 ; Mirza et al., 2012, Wu et al., 2014a), on notait que le nombre prédit de ces protéines était plus important pour le ST7 (349) que pour le ST4 (311). De plus, parmi ces peptidases, 32 étaient prédites comme sécrétées pour le ST7 et seulement 22 pour le ST4 laissant suggérer que l'isolat de ST7 présentait une virulence plus importante que le ST4 comme cela a été suggéré en particulier par Wu et al. (2014a, b). Parmi ces peptidases figurent les protéases à cystéine telles que la cathepsine et la légumine caractérisées dans le surnageant de culture du parasite de ST7 par Wawrzyniak et al. (2012). Ces mêmes protéines ont fait l'objet d'une analyse complémentaire lors de ma thèse dans laquelle j'ai eu une contribution mineure et qui a clairement montré le rôle *in vitro* de la cathepsine préalablement activée par la légumine sur l'épithélium intestinal (Nourrisson et al., 2016 ; **Annexe VII**). Les phénomènes de virulence liés à un nombre de protéases plus important ont déjà été démontrés chez les amibes parasites de l'Homme du genre *Entamoeba*. Ainsi l'espèce *E. histolytica* pathogène de l'Homme possède un plus grand nombre de protéases à cystéine que l'espèce *E. dispar*, qui n'est pas pathogène pour l'Homme (Bruchhaus et al., 1996, 2003). Cependant, il faut rester très prudent sur ce point sans avoir de données concernant le niveau d'expression de ces protéases. En effet, des études ont montré des niveaux d'expression des protéases à cystéine 10 à 100 supérieur chez une souche très pathogène de *E. histolytica* par rapport à une autre souche moins pathogène (Tannich et al., 1991 ; Davis et al., 2007). En d'autres termes, la

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

seule variation du nombre de gènes de peptidases ne suffit sans doute pas à expliquer les variations de virulence observées entre STs de *Blastocystis* sp.

*Perspectives*: Dans le cadre de ma thèse, deux autres génomes de *Blastocystis* sp. ont été séquencés par la méthode Illumina correspondant à des isolats de ST1 et ST8. Ces deux génomes ont été annotés dans le cadre d'une étroite collaboration avec nos collègues de Clermont-Ferrand et sont actuellement comparés aux ST4 et ST7. Plusieurs autres génomes de *Blastocystis* sp. ont aussi été séquencés par des collègues en Europe et au Canada. La liste de ces génomes sont disponibles sur le site de la GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/13540>) (**Figure A15**) et concernent les ST1, ST2, ST3, ST6, ST8 et ST9. Tous ces génomes permettront une très large analyse inter-ST mais aussi intra-ST puisque deux isolats ont été séquencés pour plusieurs de ces STs. D'autre part, et comme mentionné ci-dessus, cette approche de génomique comparative nécessite d'être complétée par des données de transcriptomique voire même de protéomique. Au cours de ma thèse, une collaboration avec le CEA de Marcoule (Dr J Armengaud) a été initiée et des culots cellulaires des isolats de ST1, ST4, ST7 et ST8 pour lesquels nous avons les données génomiques ont été envoyés pour une analyse de protéomique qui est en cours. En parallèle, après mise au point d'un protocole d'extraction d'ARNs de qualité optimale (**Figure A16**), ces acides nucléiques sont en cours d'extraction pour ces 4 mêmes STs afin d'être utilisés dans le cadre d'une approche de transcriptomique. Le but de ce large projet est de fournir pour ces 4 STs un « core génome – transcriptome – protéome » tout en identifiant les différences entre STs pouvant être potentiellement en lien avec leur virulence respective



**Figure A15 :** Liste actuelle des génomes de *Blastocystis* sp. séquencés et déposés à la GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/13540>) auxquels s'ajoutent le génome d'un isolat de ST7 (Denoeud et al., 2011) et ceux d'isolats de ST1 et de ST8 en cours d'annotation à Clermont-Ferrand et à Lille.

NCBI Resources How To

Genome

Limits Advanced

NCBI will be testing https on public web servers from 1:00-4:00 PM EDT (17:00-20:00 UTC) on Monday, October 24. You may experience problems with NCBI services, especially file downloads, during that time. Please plan

Organism Overview ; [Genome Assembly and Annotation report \[8\]](#) ; [Organelle Annotation Report \[3\]](#)

### Blastocystis

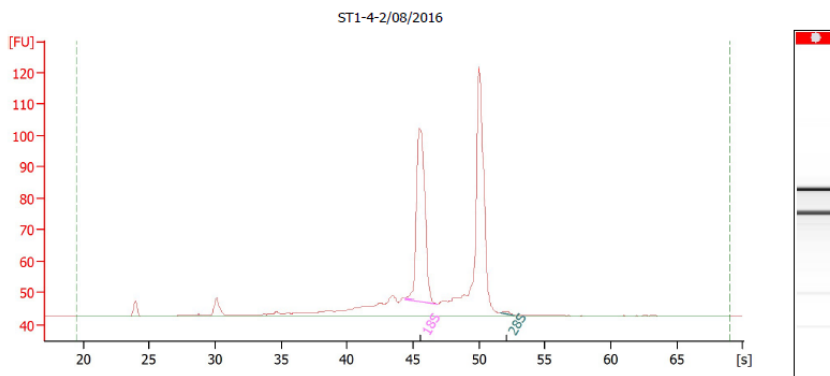
Items 1 - 8 of 8 << First < Prev Page

Organism/Name	Strain	BioSample	BioProject	Assembly	Level	Size (Mb)	GC%	Replicons	WGS	Scaffolds	Gene	Protein	Release Date
<a href="#">Blastocystis sp. subtype 4</a>	WR1	<a href="#">SAMN02949638</a>	<a href="#">PRJNA257240</a>	<a href="#">GCA_000743756.1</a>		12.9194	39.70	-	<a href="#">JPUL02</a>	1301	5707	5707	2014/08/15
<a href="#">Blastocystis sp. subtype 2</a>	-	<a href="#">SAMN03350146</a>	<a href="#">PRJNA275573</a>	<a href="#">GCA_000963386.1</a>		12.6931	54.00	-	<a href="#">JZRJ01</a>	969	-	-	2015/03/25
<a href="#">Blastocystis sp. subtype 3</a>	ZGR	<a href="#">SAMN03350147</a>	<a href="#">PRJNA275575</a>	<a href="#">GCA_000963385.1</a>		11.6514	52.00	-	<a href="#">JZRK01</a>	917	-	-	2015/03/25
<a href="#">Blastocystis sp. subtype 6</a>	-	<a href="#">SAMN03350149</a>	<a href="#">PRJNA275578</a>	<a href="#">GCA_000963415.1</a>		15.4178	43.10	-	<a href="#">JZRM01</a>	879	-	-	2015/03/25
<a href="#">Blastocystis sp. subtype 8</a>	-	<a href="#">SAMN03350150</a>	<a href="#">PRJNA275580</a>	<a href="#">GCA_000963455.1</a>		12.239	39.70	-	<a href="#">JZRN01</a>	947	-	-	2015/03/25
<a href="#">Blastocystis sp. subtype 9</a>	-	<a href="#">SAMN03350151</a>	<a href="#">PRJNA275581</a>	<a href="#">GCA_000963485.1</a>		11.7149	43.00	-	<a href="#">JZRO01</a>	871	-	-	2015/03/25
<a href="#">Blastocystis sp. ATCC 50177/Nand II</a>	NandII	<a href="#">SAMN04386717</a>	<a href="#">PRJNA308101</a>	<a href="#">GCA_001651215.1</a>		16.4683	53.00	-	<a href="#">LXWW01</a>	580	6611	6544	2016/05/24
<a href="#">Blastocystis sp. subtype 4</a>	BT1	<a href="#">SAMN03350148</a>	<a href="#">PRJNA275577</a>	<a href="#">GCA_000963395.1</a>		11.5409	39.90	-	<a href="#">JZRL01</a>	849	-	-	2015/03/25

**Figure A16 :** Profil Agilent des ARNs de l'isolat de ST1 obtenu après extraction et double DNase en vue de la réalisation d'une analyse transcriptomique. Ce profil révèle l'excellente qualité des ARNs obtenus.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Created: 10/5/2016 3:56:25 PM  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13804222\_2016-10-05\_15-56-26.xad Modified: 10/5/2016 4:20:47 PM

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 3 : ST1-4-2/08/2016**

RNA Area: 336.2 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.06)  
 RNA Concentration: 9,535 ng/ul Result Flagging Color:   
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.0 Result Flagging Label: RIN N/A

**Fragment table for sample 3 : ST1-4-2/08/2016**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	0	0	89.9	26.8
28S	0	0	0.8	0.3

## CONCLUSION

Au cours de ma thèse, j'ai pu, avec l'aide de mon équipe et dans le cadre de nombreuses collaborations, mener un programme de recherche ambitieux sur l'épidémiologie moléculaire, la transmission et la pathogénicité du protozoaire parasite *Blastocystis* sp. En effet, malgré la prévalence importante et l'impact potentiel majeur de ce parasite dans les populations humaine et animale et sa classification par l'OMS dans la liste des parasites d'origine hydrique, la biologie et la circulation de *Blastocystis* restent encore mal connues d'où l'intérêt majeur de ce projet.

Concernant l'épidémiologie et la transmission de *Blastocystis* sp., plusieurs études d'envergure en France comme à l'étranger ont été menées afin de déterminer la prévalence du parasite dans différentes cohortes de patients, la distribution des différents STs et les facteurs de risque d'infection. Les données obtenues montrent clairement l'impact considérable de ce parasite en particulier au Moyen-Orient et en Afrique d'où la nécessité de mettre en place au plus vite des stratégies de prévention et de lutte contre cette parasitose. C'est d'ailleurs le cas au Liban puisque notre équipe participe, du fait de son expertise, à la création d'une unité spécialisée dans la surveillance des infections parasitaires dans le nord du pays. En outre, la forte prévalence de *Blastocystis* sp. observée à travers une enquête multicentrique menée en France montre que ce parasite ne se limite pas qu'aux pays en voie de développement qui représentent des zones connues d'endémies mais touche aussi fortement les pays industrialisés. Avec des voyages toujours plus faciles et moins chers et des vagues croissantes de migrants venant souvent de pays à risque, il est donc fort probable que les cas de blastocystose et plus globalement de parasitoses intestinales soient en forte progression dans les années à venir dans les pays européens. Comme, de plus, *Blastocystis* sp. n'est pas recherché dans le cadre des procédures de contrôle de la qualité des eaux et n'est pas toujours considéré comme un parasite par tous les spécialistes de santé, sa diffusion ne s'en trouve que favorisée.

Un des facteurs de transmission potentiel du parasite reste le contact avec des animaux du fait de son pouvoir zoonotique. En menant la plus large étude jamais réalisée sur *Blastocystis* sp. chez les animaux en échantillonnant plus de 150 espèces hébergées dans deux zoos français puis en compilant toutes les données disponibles dans la bibliographie concernant tous les groupes d'animaux, ceux pouvant représenter un risque majeur de transmission du parasite à l'homme ont été identifiés en l'occurrence les primates, les artiodactyles et en particulier les Suidae, et les oiseaux. Ces données permettront aux responsables de parcs zoologiques et aux personnels en contact avec des animaux (éleveurs,

## CONCLUSION



gardiens de zoos, manipulateurs de viande) de prendre en compte ce risque et de limiter ainsi l'impact de cette parasitose chez l'Homme comme chez l'animal.

Concernant enfin la clarification du pouvoir pathogène de *Blastocystis* sp., mes recherches se sont d'abord orientées vers l'analyse de cas cliniques de blastocystose comme celui d'une jeune fille présentant une association entre une blastocystose de ST3 et une appendicite qui confirmait l'implication du parasite dans des pathologies intestinales. J'ai aussi cherché à déterminer l'impact de l'infection par *Blastocystis* sp. sur le microbiote intestinal bactérien et montré que la colonisation du parasite entraînait une modification significative de la composition du microbiote intestinal de l'hôte. En parallèle, j'ai activement participé à une approche de génomique comparative visant à tenter d'expliquer les variations de virulence observées entre STs de *Blastocystis* sp. Cependant, un facteur éventuellement limitant de cette approche est qu'il est possible que des variations de virulence entre STs puissent s'expliquer non pas par l'absence ou la présence de certains gènes mais par des différences en termes d'activité ou d'expression de certaines protéines d'où l'approche de transcriptomique/protéomique comparative de ces 4 STs initiée dans l'équipe. Enfin, afin de clarifier et de comparer la physiopathologie des différents STs du parasite, j'ai tenté de développer un modèle murin de blastocystose. Cependant, les parasites en culture sous forme vacuolaire semblent trop fragiles et seules les formes kystiques environnementales infecteraient les animaux d'où l'intérêt de tester différentes molécules et conditions permettant de déclencher *in vitro* le passage à la forme kystique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe N., Nagoshi M., Takami K., Sawano Y., Yoshikawa H. (2002). A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol.* 106(3): 203–212
- Abdel-Hafeez E.H., Ahmad A.K., Kamal A.M., Abdellatif M.Z.M., Abdelgelil N.H. (2015). *In vivo* antiprotozoan effects of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) extracts on experimentally infected mice with *Blastocystis* spp. *Parasitol Res.* 114(9): 3439–3444
- Abdel-Hafeez E.H., Ahmad A.K., Abdelgelil N.H., Abdellatif M.Z.M., Kamal A.M., Hassanin K.M.A., Abdel-Razik A.R., Abdel-Raheem E.M. (2016). Immunopathological assessments of human *Blastocystis* spp. in experimentally infected immunocompetent and immunosuppressed mice. *Parasitol Res.* 115(5): 2061-2071
- Abdulsalam A.M., Ithoi I., Al-Mekhlafi H.M., Khan A.H., Ahmed A., Surin J., Mak J.W. (2013a). Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasit Vectors.* 6: 86
- Abdulsalam A.M., Ithoi I., Al-Mekhlafi H.M., Al-Mekhlafi A.M., Ahmed A., Surin, J. (2013b). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates in Sebha, Libya. *PloS One.* 8(12): e84372
- Abu-Madi M.A., Behnke J.M., Doiphode S.H. (2010). Changing trends in intestinal parasitic infections among long-term-residents and settled immigrants in Qatar. *Parasit Vectors.* 3: 98
- Abu-Madi M., Aly M., Behnke J.M., Clark C.G., Balkhy H. (2015). The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasit Vectors.* 8: 465
- Abu-Madi M.A., Behnke J.M., Boughattas S., Al-Thani A., Doiphode S.H. (2016). A decade of intestinal protozoan epidemiology among settled immigrants in Qatar. *BMC Infect Dis.* 16: 370
- AbuOdeh R., Ezzedine S., Samie A., Stensvold C.R., ElBakri A. (2016). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* in healthy individuals in Sharjah, United Arab Emirates. *Infect Genet Evol.* 37: 158–162

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed M.A., Alam-Eldin Y.H., Eltaweel N.A., Elmorsy S. (2015). Intestinal parasites detected during pre-employment stool examination at tertiary health care center in makkah, kingdom of Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* 45(2): 367–373
- Ajjampur S.S.R., Tan K.S.W. (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int.* 65(6 Pt B): 772-779
- Ajjampur S.S.R., Png C.W., Chia W.N., Zhang Y., Tan K.S.W. (2016). *Ex Vivo* and *In Vivo* Mice Models to Study *Blastocystis* spp. Adhesion, Colonization and Pathology: Closer to Proving Koch's Postulates. *PloS ONE.* 11(8): e0160458
- Al-Fellani M.A., Khan A.H., Al-Gazoui R.M., Zaid M.K., Al-Ferjani M.A. (2007). Prevalence and Clinical Features of *Blastocystis hominis* Infection among Patients in Sebha, Libya. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 7(1): 35–40
- Alemu A., Shiferaw Y., Getnet G., Yalew A., Addis Z. (2011). Opportunistic and other intestinal parasites among HIV/AIDS patients attending Gambi higher clinic in Bahir Dar city, North West Ethiopia. *Asian Pac J Trop Med.* 4(8): 661–665
- Alfellani M.A., Taner-Mulla D., Jacob A.S., Imeede CA., Yoshikawa H., Stensvold C.R., Clark C.G. (2013a). Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist.* 164(4): 497–509
- Alfellani M.A., Stensvold C.R., Vidal-Lapiedra A., Onuoha E.S.U., Fagbenro-Beyioku A.F., Clark C.G. (2013b). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 126(1): 11–18
- Alfellani M.A., Jacob A.S., Perea N.O., Krecek R.C., Taner-Mulla D., Verweij J.J., Leveck B., Tannich E., Clark C.G., Stensvold C.R. (2013c). Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology.* 140(8): 966–971
- Amin O.M. (2006). The Epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. *Res J Parasitol.* 1(1): 1-10.
- Andersen L.O., Bonde I., Nielsen H.B., Stensvold C.R. (2015). A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol Ecol.* 91(7)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andersen L.O., Stensvold C.R. (2016). *Blastocystis* in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? *J Clin Microbiol.* 54(3): 524–528
- Andiran N., Acikgoz Z.C., Turkey S., Andiran F. (2006). *Blastocystis hominis*—an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *J Pediatr Surg.* 41(8): 1489-1491
- Anuar T.S., Ghani M.K.A., Azreen S.N., Salleh F.M., Moktar N. (2013). *Blastocystis* infection in Malaysia: evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasit Vectors.* 6: 40
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto JM., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., et al (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 473(7346): 174–180
- Badparva E., Sadraee J., Kheirandish F., Frouzandeh M. (2014). Genetic diversity of human *Blastocystis* isolates in khorramabad, central iran. *Iran J Parasitol.* 9(1): 44–49
- Bart A., Wentink-Bonnema E.M.S., Gilis H., Verhaar N., Wassenaar C.J.A., van Vugt M., Goorhuis A., van Gool T. (2013). Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 13: 389
- Belleza M.L.B., Reyes J.C.B., Tongol-Rivera P.N., Rivera W.L. (2016). Subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from human and canine hosts in an urban community in the Philippines. *Parasitol Int.* 65(3): 291–294
- Belleza M.L., Cadacio J.L., Borja M.P., Solon J.A., Padilla M.A., Tongol-Rivera P.N., Rivera W.L. (2015). Epidemiologic Study of *Blastocystis* Infection in an Urban Community in the Philippines. *J Environ Public Health.* 2015: 894297
- Ben-Shimol S., Sagi O., Greenberg D. (2014). Differences in prevalence of parasites in stool samples between three distinct ethnic pediatric populations in southern Israel, 2007-2011. *Parasitol Int.* 63(2) : 456–462
- Bergamo Do Bomfim T.C., Carvalho M., Do Couto M. (2013). Morphological diagnosis and occurrence of *Blastocystis* spp. obtained from the stool samples of domestic bird species commercialized in municipal markets. *J Parasitol Vector Biol.* 5(3): 20–26

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boondit J., Pipatsatitpong D., Mungthin M., Taamasri P., Tan-ariya P., Naaglor T., Leelayoova S. (2014). Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in orphans at the Babies' Home, Nonthaburi Province, Thailand. *J Med Assoc Thai.* 97 Suppl 2: S52-59
- Boorom K.F., Smith H., Nimri L., Viscogliosi E., Spanakos G., Parkar U., Li L.H., Zhou X.N., Ok U.Z., Leelayoova S., Jones, M.S. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors.* 1(1): 40
- Boreham P.F., Stenzel D.J. (1993). *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv Parasitol.* 32: 1–70
- Bourée P. (2007). *Blastocystis* : commensal ou pathogène ? Étude de 590 cas et revue de la littérature. *Antibiotiques.* 9(1) : 20–24
- Bourlioux P. (2014). Current view on gut microbiota. . *Ann Pharm Fr.* 72(1): 15–21
- Broadhurst M.J., Ardeshir A., Kanwar B., Mirpuri J., Gundra U.M., Leung J.M., Wiens K.E., Vujkovic-Cvijin I., Kim C.C., Yarovinsky F., Lerche N.W., McCune J.M., Loke P. (2012). Therapeutic helminth infection of macaques with idiopathic chronic diarrhea alters the inflammatory signature and mucosal microbiota of the colon. *PLoS Pathog.* 8(11): e1003000
- Bruchhaus I., Jacobs T., Leippe M., Tannich E. (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol.* 22(2): 255–263
- Bruchhaus I., Loftus B.J., Hall N., Tannich E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell.* 2(3): 501–509
- Calderaro A., Montecchini S., Rossi S., Gorrini C., De Conto F., Medici M.C., Chezzi C., Arcangeletti M.C. (2014). Intestinal parasitoses in a tertiary-care hospital located in a non-endemic setting during 2006-2010. *BMC Infect Dis.* 14: 264
- Chen X.Q., Singh M., Ho L.C., Tan S.W., Ng G.C., Moe K.T., Yap E.H. (1997). Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitol Res.* 83(4): 313–318

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cheng J., Palva A.M., de Vos W.M., Satokari R. (2013). Contribution of the intestinal microbiota to human health: from birth to 100 years of age. *Curr Top Microbiol Immunol.* 358: 323–346
- Clark C.G., van der Giezen M., Alfellani M.A., Stensvold C.R. (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitolo.* 82: 1–32
- Collins S.M. (2014). A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 11(8): 497–505
- David É.B., Guimarães S., de Oliveira A.P., Goulart de Oliveira-Sequeira T.C., Nogueira Bittencourt G., Moraes Nardi A.R., Martins Ribolla A.R., Bueno Franco R.M., Branco N., Tosini F., Bella A., Pozio E., Cacciò S.M. (2015). Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors.* 8: 103
- Davis P.H., Schulze J., Stanley S.L. (2007). Transcriptomic comparison of two *Entamoeba histolytica* strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol.* 151(1): 118–128
- Daryani A., Sharif M., Nasrolahei M., Khalilian A., Mohammadi A., Barzegar G. (2012). Epidemiological survey of the prevalence of intestinal parasites among schoolchildren in Sari, northern Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106(8): 455–459
- Deniz K., Sökmensüer L.K., Sökmensüer C., Patisroğlu T.E. (2007). Significance of intraepithelial lymphocytes in appendix. *Pathol Res Pract.* 203(10): 731–735
- Denoeud F., Roussel M., Noel B., Wawrzyniak I., Da Silva C., Diogon M., Viscogliosi E., Brochier-Armanet C., Couloux A., Poulain J., Seurens B., Anthouard V., Texier C., Blot N., Poirier P., Ng G.C., Tan K.S., Artiguenave F., Jaillon O., Aury J.M., Delbac F., Wincker P., Vivarès CP., El Alaoui H. (2011). Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 12(3): R29
- de Vos W.M., de Vos E.A.J. (2012). Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev.* 70 Suppl 1: S45-56



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dib J.R., Fernández-Zenoff M.V, Oquilla J., Lazarte S., González S.N. (2015). Prevalence of intestinal parasitic infection among children from a shanty town in Tucuman, Argentina. *Trop Biomed.* 32(2): 210–215
- El Deeb H.K., Khodeer S. (2013). *Blastocystis* spp.: frequency and subtype distribution in iron deficiency anemic versus non-anemic subjects from Egypt. *J Parasitol.* 99(4): 599–602
- El Fatni C., Olmo F., El Fatni H., Romero D., Rosales M.J. (2014). First genotyping of *Giardia duodenalis* and prevalence of enteroparasites in children from Tetouan (Morocco). *Parasite.* 21: 48
- Elwakil H.S., Hewedi I.H. (2010). Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitol Res.* 107(3): 685–689
- Engsbro A.L., Stensvold C.R., Vedel Nielsen H., Bytzer P. (2014). Prevalence, incidence, and risk factors of intestinal parasites in Danish primary care patients with irritable bowel syndrome. *Scand J Infect Dis.* 46(3): 204–209
- Fallahi S., Rostami A., Mohammadi M., Ebrahimzadeh F., Pournia Y. (2016). Practical parasitology courses and infection with intestinal parasites in students. *J Infect Public Health.* 9(5), 654–660
- Fayer R., Santin M., Macarasin D. (2012). Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitol Res.* 111(3): 1349–1355
- Fletcher K.I.G., van West P., Gachon C.M.M. (2016). Nonagonal cadherins: A new protein family found within the Stramenopiles. *Gene.* 593(1): 64–75
- Forsell J., Granlund M., Samuelsson L., Koskiniemi S., Edebro H., Evengård B. (2016). High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasit Vectors.* 9(1): 370
- Fouad S.A., Basyoni M.M.A., Fahmy R.A., Kobaisi M.H. (2011). The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab J Gastroenterol.* 12(4): 194–200

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Garcia L.S. (2016). *Dientamoeba fragilis*, One of the Neglected Intestinal Protozoa. *J Clin Microbiol.* 54(9): 2243–2250
- González-Moreno O., Domingo L., Teixidor J., Gracenea M. (2011). Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Res.* 108(1): 87–93
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 27(2): 221–224
- Gualdieri L., Rinaldi L., Petruzzo L., Morgoglione M.E., Maurelli M.P., Musella V., Piemonte M., Caravano L., Coppola M.G., Cringoli G. (2011). Intestinal parasites in immigrants in the city of Naples (southern Italy). *Acta Trop.* 117(3): 196–201
- Guglielmetti P., Cellesi C., Figura N., Rossolini A. (1989). Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. *Lancet.* 2(8676): 1394
- Haider S.S., Baqai R., Qureshi F.M., Boorom K. (2012). *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Entamoeba histolytica* exhibit similar symptomatic and epidemiological patterns in healthcare-seeking patients in Karachi. *Parasitol Res.* 111(3): 1357–1368
- Haghighi A., Kobayashi S., Takeuchi T., Thammapalerd N., Nozaki T. (2003). Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. *J Clin Microbiol.* 41(8): 3748–3756
- Haghighi A., Khorashad A.S., Nazemalhosseini Mojarad E., Kazemi B., Rostami Nejad M., Rasti S. (2009). Frequency of enteric protozoan parasites among patients with gastrointestinal complaints in medical centers of Zahedan, Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(5): 452–454
- Hamze M., Dabboussi F., Al-Ali K., Ourabi L. (2004). Prevalence of infection by intestinal parasites in north Lebanon: 1997-2001. *Eastern Mediterr Health J.* 10(3): 343–348
- Harhay M.O., Horton J., Olliaro P.L. (2010). Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 8(2): 219–234

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hassen Amer O., Ashankyty I.M., Haouas N.A.S. (2016). Prevalence of intestinal parasite infections among patients in local public hospitals of Hail, Northwestern Saudi Arabia. *Asian Pac J Trop Med.* 9(1): 44–48
- Ho L.C., Singh M., Suresh G., Ng G.C., Yap E.H. (1993). Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res.* 79(7): 614–616
- Hussein E.M., Hussein A.M., Eida M.M., Atwa M.M. (2008). Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res.* 102(5): 853–860
- Iebba V., Santangelo F., Totino V., Pantanella F., Monsia A., Di Cristanziano V., Di Cave D., Schippa S., Berrilli F., D'Alfonso R. (2016). Gut microbiota related to *Giardia duodenalis*, *Entamoeba spp.* and *Blastocystis hominis* infections in humans from Côte d'Ivoire. *J Infect Dev Ctries.* 10(9): 1035–1041
- Iguchi A., Ebisu A., Nagata S., Saitou Y., Yoshikawa H., Iwatani S., Kimata I. (2007). Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol Int.* 56(2): 107–112
- Iguchi A., Yoshikawa H., Yamada M., Kimata I., Arizono N. (2009). Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. *Parasitol Res.* 105(1): 135–140
- Ithoi I., Jali A., Mak J.W., Wan Sulaiman W.Y., Mahmud R. (2011). Occurrence of *Blastocystis* in water of two rivers from recreational areas in malaysia. *J Parasitol Res.* 2011: 123916
- Jafari R., Sharifi F., Bagherpour B., Safari M. (2016). Prevalence of intestinal parasites in Isfahan city, central Iran, 2014. *J Parasit Dis.* 40(3): 679–682
- Jantermtor S., Pinlaor P., Sawadpanich K., Pinlaor S., Sangka A., Wilailuckana C., Wongsena W., Yoshikawa H. (2013). Subtype identification of *Blastocystis* spp. isolated from patients in a major hospital in northeastern Thailand. *Parasitol Res.* 112(4): 1781–1786
- Karasartova D., Gureser A.S., Zorlu M., Turegun-Atasoy B., Taylan-Ozkan A., Dolapci M. (2016). Blastocystosis in post-traumatic splenectomized patients. *Parasitol Int.* 65(6 Pt B): 802–805

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khoshnood S., Rafiei A., Saki J., Alizadeh K. (2015). Prevalence and Genotype Characterization of *Blastocystis hominis* Among the Baghmalek People in Southwestern Iran in 2013 - 2014. *Jundishapur J Microbiol.* 8(10): e23930
- Kiani H., Haghighi A., Rostami A., Azargashb E., Tabaei SJ., Solgi A., Zebardast N. (2016). Prevalence, risk factors and symptoms associated to intestinal parasite infections among patients with gastrointestinal disorders in nahavand, western iran. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 58:42
- Klemba M., Goldberg D.E. (2002). Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem.* 71: 275–305
- Knights D., Ward T.L., McKinlay C.E., Miller H., Gonzalez A., McDonald D., Knight R. (2014). Rethinking “enterotypes”. *Cell Host Microbe.* 16(4): 433–437
- Koltas I.S., Eroglu F. (2016). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates using SSU rRNA-DNA sequencing in rural and urban population in southern Turkey. *Exp Parasitol.* 170: 247–251
- Koren O., Knights D., Gonzalez A., Waldron L., Segata N., Knight R., Huttenhower C., Ley RE. (2013). A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Comput Biol.* 9(1): e1002863
- Krogsgaard L.R., Engsbro A.L., Stensvold C.R., Nielsen H.V., Bytzer P. (2015). The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 13(3): 507–513
- Kumarasamy V., Roslani A.C., Rani K.U., Kumar Govind S. (2014). Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasit Vectors.* 7: 162
- Kurniawan A., Karyadi T., Dwintarsi S.W., Sari I.P., Yuniastuti E., Djauzi S., Smith H.V. (2009). Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(9): 892–898
- Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M., Arumugam M., Batto J.M., Kennady S., Leonard P., Li J., Burgdorf K., Grarup N., Jorgensen T.,

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brandslund I., Nielsen H.B., Juncker A.S., Bertalan M., Levenez F., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 500(7464): 541–546
- Lee M.G., Stenzel D.J. (1999). A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitol Res*. 85(2): 109–117
- Lee L.I., Chye T.T., Karmacharya B.M., Govind S.K. (2012a). *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasit Vectors*. 5: 130
- Lee I.L., Tan T.C., Tan P.C., Nanthiney D.R., Biraj M.K., Surendra K.M., Suresh K.G. (2012b). Predominance of *Blastocystis* sp. subtype 4 in rural communities, Nepal. *Parasitol Res*. 110(4): 1553–1562
- Lee S.C., Tang M.S., Lim Y.A.L., Choy S.H., Kurtz Z.D., Cox L.M., Gundra U.M., Cho I., Bonneau R., Blaser M.J., Chua K.H., Loke P. (2014). Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(5): e2880
- Leelayoova S., Siripattanapong S., Thathaisong U., Naaglor T., Taamasri P., Piyaraj P., Mungthin M. (2008). Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 79(3): 401–406
- Li J., Deng T., Li X., Cao G., Li X., Yan Y. (2013). A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol Res*. 112(10): 3537–3541
- Li L.H., Zhang X.P., Lv S., Zhang L., Yoshikawa H., Wu Z., Steinmann P., Utzinger J., Tong X.M., Chen S.H., Zhou X.N. (2007a). Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res*. 102(1): 83–90
- Li L.H., Zhou X.N., Du Z.W., Wang X.Z., Wang L.B., Jiang J.Y., Yoshikawa H., Steinmann P., Utzinger J., Wu Z., Chen J.X., Chen S.H., Zhang L. (2007b). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol Int*. 56(4): 281–286
- Lintong P.M., Sambuaga M.K., Tambajong E.H. (2012). Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2: S965–S968

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Londoño-Franco A.L., Loaiza-Herrera J., Lora-Suárez F.M., Gómez-Marín J.E. (2014). *Blastocystis* sp . frequency and sources among children from 0 to 5 years of age attending public day care centers in Calarcá, Colombia. *Biomédica*. 34(2): 218–227
- Lucía J.F., Aguilar C., Betran A. (2007). *Blastocystis hominis* colitis in a haemophilic patient as a cause of lower gastrointestinal bleeding. *Haemophilia*. 13(2): 224–225
- Maas L., Dorigo-Zetsma J.W., de Groot C.J., Bouter S., Plötz F.B., van Ewijk B.E. (2014). Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 20(6): 545–550
- Marcos L.A., Gotuzzo E. (2013). Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis*. 26(4): 295–301
- Masucci L., Graffeo R., Bani S., Bugli F., Boccia S., Nicolotti N., Fiori B., Fadda G., Spanu T. (2011). Intestinal parasites isolated in a large teaching hospital, Italy, 1 May 2006 to 31 December 2008. *Euro Surveill*. 16(24)
- Mattiucci S., Crisafi B., Gabrielli S., Paoletti M., Cancrini G. (2016). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiol Infect*. 144(3): 635–646
- Meloni D., Sanciu G., Poirier P., El Alaoui H., Chabé M., Delhaes L., Dei-Cas E., Delbac F., Luigi Fiori P., Di Cave D., Viscogliosi, E. (2011). Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res*. 109(3): 613–619
- Mirza H., Tan K.S.W. (2009). *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res*. 104(2): 355–361
- Mirza H., Wu Z., Teo J.D.W., Tan K.S.W. (2012). Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell Microbiol*. 14(9): 1474–1484
- Moe K.T., Singh M., Howe J., Ho L.C., Tan S.W., Chen X.Q., Ng G.C., Yap E.H. (1997). Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol Res*. 83(4): 319–325

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Moe K.T., Singh M., Gopalakrishnakone P., Ho L.C., Tan S.W., Chen X.Q., Yap E.H. (1998). Cytopathic effect of *Blastocystis hominis* after intramuscular inoculation into laboratory mice. *Parasitol Res.* 84(6): 450–454
- Moosavi A., Haghighi A., Mojarad EN., Zayeri F., Alebouyeh M., Khazan H., Kazemi B., Zali M.R. (2012). Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran. *Parasitol Res.* 111(6): 2311–2315
- Morton E.R., Lynch J., Froment A., Lafosse S., Heyer E., Przeworski M., Biekman R., Ségurel L. (2015). Variation in Rural African Gut Microbiota Is Strongly Correlated with Colonization by *Entamoeba* and Subsistence. *PLoS Genet.* 11(11): e1005658
- Nagel R., Cuttler L., Stensvold C.R., Mills P.C., Bielefeldt-Ohmann H., Traub R.J. (2012). *Blastocystis* subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern Med J.* 42(11): 1187–1195
- Nasirudeen A.M., Tan K.S. (2004). Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *J Microbiol Methods.* 58(1): 101–109
- Navarro C., Domínguez-Márquez M.V., Garijo-Toledo M.M., Vega-García S., Fernández-Barredo S., Pérez-Gracia M.T., Garcia A., Borrás R., Gómez-Muñoz M.T. (2008). High prevalence of *Blastocystis* sp. in pigs reared under intensive growing systems: frequency of ribotypes and associated risk factors. *Vet Parasitol.* 153(3–4): 347–358
- Ndir I., Gaye A., Sy M., Gaye O., Ndir O. (2002). Prevalence of intestinal parasitosis at the King Baudouin health center of Guediawaye (Senegal). *Dakar Medical.* 47(2): 168–171
- Noël C., Dufernez F., Gerbod D., Edgcomb V.P., Delgado-Viscogliosi P., Ho L.C., Singh M., Wintjens R., Sogin M.L., Capron M., Pierce R., Zenner L., Viscogliosi E. (2005). Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol.* 43(1): 348–355
- Nourrisson C., Scanzi J., Pereira B., NkoudMongo C., Wawrzyniak I., Cian A., Viscogliosi E., Livrelli V., Delbac F., Dapoigny M., Poirier P. (2014). *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PloS One.* 9(11) : e111868

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nourrisson C., Wawrzyniak I., Cian A., Livrelli V., Viscogliosi E., Delbac F., Poirier P. (2016). On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology*. 143(13): 1713–1722
- O'Hara A.M., Shanahan F.(2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 7(7): 688–693
- Osman M., Bories J., El Safadi D., Poirel M.T., Gantois N., Benamrouz-Vanneste S., Delhaes L., Hugonnard M., Cartad G., Zenner L., Viscogliosi, E. (2015). Prevalence and genetic diversity of the intestinal parasites *Blastocystis* sp. and *Cryptosporidium* spp. in household dogs in France and evaluation of zoonotic transmission risk. *Vet Parasitol*. 214(1-2): 167–170
- Parkar U., Traub R.J., Kumar S., Mungthin M., Vitali S., Leelayoova S., Morris K., Thompson R.C. (2007). Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology*. 134(Pt 3): 359–367
- Parkar U., Traub R.J., Vitali S., Elliot A., Levecke B., Robertson I., Geureden T., Steele J., Drake B., Thompson R.C.A. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Vet Parasitol*. 169(1-2): 8–17
- Pavanelli M.F., Kaneshima E.N., Uda C.F., Colli C.M., Falavigna-Guilherm A.L., Gomes M.L. (2015). Pathogenicity of *Blastocystis* sp. to the gastrointestinal tract of mice: relationship between inoculum size and period of infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 57(6): 467–472
- Pérez-Brocal V., Clark C.G. (2008). Analysis of two genomes from the mitochondrion-like organelle of the intestinal parasite *Blastocystis*: complete sequences, gene content, and genome organization. *Mol Biol Evol*. 25(11): 2475–2482
- Pestehchian N., Nazari M., Haghghi A., Salehi M., Yosefi H. A., Khosravi N. (2015). Prevalence of Intestinal Parasitic Infection Among Inhabitants and Tribes of Chelgerd, Iran, 2008-2009. *J Clin Diag Res*. 9(5): LC01-04
- Petersen A.M., Stensvold C.R., Mirsepasi H., Engberg J., Friis-Møller A., Porsbo L.J., Hammerum A.M., Nordgaard-Lassen I., Nielsen H.V., Krogfelt K.A. (2013). Active



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scand J Gastroenterol.* 48(5): 638–639
- Petrášová J., Uzlíková M., Kostka M., Petrželková K.J., Huffman M.A., Modrý D. (2011). Diversity and host specificity of *Blastocystis* in syntopic primates on Rubondo Island, Tanzania. *Int J Parasitol.* 41(11): 1113–1120
- Pham T.A.N., Lawley T.D. (2014). Emerging insights on intestinal dysbiosis during bacterial infections. *Curr Opin Microbiol.* 17: 67–74
- Pinel C., Réjasse C., Picot S., Brenier-Pinchart M.P., Grillot R., Ambroise-Thomas P. (1999). *Blastocystis hominis* : réflexions épidémiologiques et cliniques à propos de plus de 3500 examens coprologiques. *Ann Biol Clin (Paris).* 57: 601-604
- Pipatsatitpong D., Rangsin R., Leelayoova S., Naaglor T., Mungthin M. (2012). Incidence and risk factors of *Blastocystis* infection in an orphanage in Bangkok, Thailand. *Parasit Vectors.* 5: 37
- Pipatsatitpong D., Leelayoova S., Mungthin M., Aunpad R., Naaglor T., Rangsin R. (2015). Prevalence and Risk Factors for *Blastocystis* Infection Among Children and Caregivers in a Child Care Center, Bangkok, Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 93(2): 310–315
- Poirier P., Wawrzyniak I., Albert A., El Alaoui H., Delbac F., Livrelli V. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 49(3): 975–983
- Poirier P., Wawrzyniak I., Vivarès C.P., Delbac F., El Alaoui H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8(3): e1002545
- Poirier P., Meloni D., Nourrisson C., Wawrzyniak I., Viscogliosi E., Livrelli V., Delbac F. (2014). Molecular subtyping of *Blastocystis* spp. using a new rDNA marker from the mitochondria-like organelle genome. *Parasitology.* 141(5): 670–681

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Poulsen C.S., Efunshile A.M., Nelson J.A., Stensvold C.R. (2016). Epidemiological Aspects of *Blastocystis* Colonization in Children in Ilero, Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 95(1): 175–179
- Pritt B.S., Clark C.G. (2008). Amebiasis. *Mayo Clin Proc.* 83(10): 1154–1159
- Puthia M.K., Vaithilingam A., Lu J., Tan K.S.W. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res.* 97(5): 386–389
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 464(7285): 59–65
- Raetz M., Hwang S.H., Wilhelm CL., Kirkland D., Benson A., Sturge C.R., Mirpuri J., Vaishnava S., Hou B., Defranco A.L., Glipin C.J., Hooper L.V., Yarovinsky F. (2013). Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- $\gamma$ -dependent elimination of Paneth cells. *Nat Immunol.* 14(2): 136–142
- Ramírez J.D., Sánchez A., Hernández C., Flórez C., Bernal M.C., Giraldo JC., Reyes P., Lopez M.C., Garcia L., Cooper P.J., Vicuna Y., Mongi F., Casero R.D. (2016). Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 41: 32–35
- Ras R., Huynh K., Desoky E., Badawy A., Widmer G. (2015). Perturbation of the intestinal microbiota of mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Int J Parasitol.* 45(8): 567–573
- Rebolla M.F., Silva E.M., Gomes J.F., Falcão A.X., Rebolla M.V.F., Franco R.M.B. (2016). High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in são paulo state, brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 58: 31
- Roberts T., Stark D., Harkness J., Ellis J.(2013). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from a variety of animals from New South Wales, Australia. *Vet Parasitol.* 196(1-2): 85–89
- Roberts T., Stark D., Harkness J., Ellis J. (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog.* 6: 17

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rossen N.G., Bart A., Verhaar N., van Nood E., Kootte R., de Groot P.F., D'Haens G.R., Ponsioen C.Y., van Gool T. (2015). Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34(5): 1039–1044
- Rostami Nejad M., Nazemalhosseini Mojarad E., Dabiri H., Nochi Z., Pourhoseingholi M.A., Sahebkhari N., Habibi M., Zali M.R. (2010). A case-control study of *Blastocystis* hominis among Iranian population. *East Afr J Public Health.* 7(1): 101–104
- Ruau C.G., Stang B.V. (2014). Prevalence of *Blastocystis* in shelter-resident and client-owned companion animals in the US Pacific Northwest. *PLoS One.* 9(9): e107496
- Russell D.A., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol.* 149(1): 88–105
- Santín M., Gómez-Muñoz M.T., Solano-Aguilar G., Fayer R. (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res.* 109(1): 205–212
- Santos H.J., Rivera W.L. (2009). Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis* hominis in sera and intestinal secretions of orally infected mice. *Parasitol Res.* 105(5): 1303–1310
- Santos H.J., Rivera W.L. (2013). Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp. in human stool samples. *Asian Pac J Trop Med.* 6(10): 780–784
- Scanlan P.D., Marchesi J.R. (2008). Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *ISME J.* 2(12): 1183–1193
- Scanlan P.D., Stensvold C.R. (2013). *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* 29(11): 523–529
- Scanlan P.D., Stensvold C.R., Rajilić-Stojanović M., Heilig H.G.H.J., De Vos W.M., O'Toole P.W., Cotter P.D. (2014). The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 90(1): 326–330

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Scicluna S.M., Tawari B., Clark C.G. (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 157(1): 77–85
- Sharif M., Daryani A., Kia E., Rezaei F., Nasiri M., Nasrolahei M. (2015). Prevalence of intestinal parasites among food handlers of Sari, Northern Iran. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 57(2): 139–144
- Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermúdez-Humarán L.G., Gratadoux J.J., Blugeon S., Bridonneau C., Furet J.P., Corthier G., Grangette C., Vasquez N., Pochart P., Trugnan G., Thomas G., Blottière H.M., Doré J., Marteau P., Seksik P., Langella P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(43) : 16731–16736
- Souppart L., Sanciu G., Cian A., Wawrzyniak I., Delbac F., Capron M., Dei-Cas E., Boorom K., Delhaes L., Viscogliosi E. (2009). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res*. 105(2): 413–421
- Souppart L., Moussa H., Cian A., Sanciu G., Poirier P., El Alaoui H., Delbac F., Boorom K., Delhaes L., Dei-Cas E., Viscogliosi E. (2010). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res*. 106(2): 505–511
- Speich B., Marti H., Ame S.M., Ali S.M., Bogoch I.I., Utzinger J., Albonico M., Keiser J. (2013). Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide and albendazole-nitazoxanide. *Parasit Vectors*. 6(1): 3
- Stark D., van Hal S., Marriott D., Ellis J., Harkness J. (2007). Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol*. 37(1): 11–20
- Stark D., Barratt J., Chan D., Ellis J.T. (2016). *Dientamoeba fragilis*, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel. *Clin Microbiol Rev*. 29(3): 553–580
- Stechmann A., Hamblin K., Pérez-Brocal V., Gaston D., Richmond G.S., van der Giezen M., Clark C.G., Roger A.J. (2008). Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol*. 18(8): 580–585

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stensvold C.R., Clark C.G. (2016). Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 65(6 Pt B): 763-771
- Stensvold C.R., Arendrup M.C., Jespersgaard C., Mølbak K., Nielsen H.V. (2007). Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diag Microbiol Infect Dis.* 59(3): 303–307
- Stensvold C.R., Alfellani M.A., Norskov-Lauritsen S., Prip K., Victory E.L., Maddox C., Nielsen H.V., Clark C.G. (2009a). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol.* 39(4): 473–479
- Stensvold C.R., Lewis H.C., Hammerum A.M., Porsbo L.J., Nielsen S.S., Olsen K.E., Arendrup M.C., Nielsen H.V., Mølbak K. (2009b). *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect.* 137(11): 1655–1663
- Stensvold C.R., Christiansen D.B., Olsen K.E., Nielsen H.V. (2011). *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg.* 84(6): 883–885
- Stenzel D.J., Boreham P.F. (1996). *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol.* 9(4): 563–584.
- Suresh K., Ng G.C., Ramachandran N.P., Ho L.C., Yap E.H., Singh M. (1993). *In vitro* encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 79(6): 456–460
- Suresh K., Smith H. (2004). Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23(6) : 509–511
- Suresh K., Smith H.V, Tan T.C. (2005). Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Appl Environ Microbiol.* 71(9): 5619–5620
- Tai W.P., Hu P.J., Wu J., Lin X.C. (2011). Six ulcerative colitis patients with refractory symptoms co-infective with *Blastocystis hominis* in China. *Parasitol Res.* 108(5): 1207–1210

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tan K.S.W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 21(4): 639–665
- Tan K.S.W., Mirza H., Teo J.D., Wu B., Macary P.A. (2010). Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep.* 12(1): 28–35
- Tanizaki A., Yoshikawa H., Iwatani S., Kimata I. (2005). Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. *Parasitol Res.* 96(1): 57–61
- Tannich E., Scholze H., Nickel R., Horstmann R.D. (1991). Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Differences in structure and expression. *J Biol Chem.* 266(8): 4798–4803
- Tellevik M.G., Moyo S.J., Blomberg B., Hjøllø T., Maselle S.Y., Langeland N., Hanevik K. (2015). Prevalence of *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* among Young Children with and without Diarrhea in Dar es Salaam, Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(10): e0004125
- Thanikachalam M.P., Kasemsuk Y., Mak J.W., Sharifah Emilia T.S., Kandasamy P. (2008). A study of parasitic infections in the luminal contents and tissue sections of appendix specimens. *Trop Biomed.* 25(2): 166–172
- van der Giezen M., Tovar J. (2005). Degenerate mitochondria. *EMBO Rep.* 6(6): 525–530
- Wang K.X., Li C.P., Wang J., Cui Y.B. (2002). Epidemiological survey of *Blastocystis hominis* in Huainan city, Anhui Province, China. *World J Gastroenterol.* 18:928-932
- Wang W., Cuttall L., Bielefeldt-Ohmann H., Inpankaew T., Owen H., Traub R.J. (2013). Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasit Vectors.* 6 : 215
- Wang W., Owen H., Traub R.J., Cuttall L., Inpankaew T., Bielefeldt-Ohmann H. (2014). Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Vet Parasitol.* 203(3-4): 264–269
- Wawrzyniak I., Roussel M., Diogon M., Couloux A., Texier C., Tan K.S.W., Vivarès C.P, Delbac F., Wincker P., El Alaoui H. (2008). Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol.* 38 (12): 1377-1382

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wawrzyniak I., Texier C., Poirier P., Viscogliosi E., Tan K.S.W., Delbac F., El Alaoui H. (2012). Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitol Int.* 61(3): 437–442
- Wawrzyniak I., Poirier P., Viscogliosi E., Dionigia M., Texier C., Delbac F., El Alaoui H. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Theor Advn Infect Dis.* 1(5): 167–178
- Windsor J.J., Macfarlane L., Hughes-Thapa G., Jones S.K.A., Whiteside T.M. (2002). Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *Br J Biomed Sci.* 59(3): 154–157
- Winter S.E., Bäumlner A.J. (2014). Why related bacterial species bloom simultaneously in the gut: principles underlying the “Like will to like” concept. *Cell Microbiol.* 16(2): 179–184
- Wong K.H.S., Ng G.C., Lin R.T.P., Yoshikawa H., Taylor M.B., Tan K.S.W. (2008). Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res.* 102(4): 663–670
- Wu G., Yishu X., Gaolu C., Guangming L.M.L., Jinglin Z. (2000). Investigation of an epidemic outbreak of blastocystiasis. *Chin J Parasitol Dis Control.* 13: 25-27
- Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Gilroy E., Gupta K., Balsassano R., Nessel L., Li H., Bushman F.D., Lewis J.D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 334(6052): 105–108
- Wu Z., Mirza H., Tan K.S.W. (2014a). Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(5): e2885
- Wu Z., Mirza H., Teo J.D.W., Tan K.S.W. (2014b). Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *Biomed Res Int.* 2014: 209163

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Yason J.A., Ajjampur S.S.R., Tan K.S.W. (2016). *Blastocystis* Isolate B Exhibits Multiple Modes of Resistance against Antimicrobial Peptide LL-37. *Infect Immun.* 84(8): 2220–2232
- Yamada M., Yoshikawa H., Tegoshi T., Matsumoto Y., Yoshikawa T., Shiota T., Yoshida Y. (1987). Light microscopical study of *Blastocystis* spp. in monkeys and fowls. *Parasitol Res.* 73(6): 527–531
- Yoshikawa H., Yoshida K., Nakajima A., Yamanari K., Iwatani S., Kimata I. (2004). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol Res.* 94(6): 391–396
- Yoshikawa H., Wu Z., Pandey K., Pandey B.D., Sherchand J.B., Yanagi T., Kanbara H. (2009). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal. *Vet Parasitol.* 160(3-4): 295–300
- Yoshikawa H., Koyama Y., Tsuchiya E., Takami K. (2016a). *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol Int.* 65(6Pt B): 750-759
- Yoshikawa H., Tokoro M., Nagamoto T., Arayama S., Asih P.B.S., Rozi I.E., Syafruddin D. (2016b). Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int.* 65(6 Pt B): 780–784
- Zhou X.B., Zhang X., Qiao J.Y., Cai J., Cheng S., Yuan Y., Li J. (2010). Encystation--survival of *Blastocystis hominis* in immunocompetent mice abdomen cavity. *Parasitol Res.* 106(6): 1315–1320



# ANNEXES

## Annexe I : Activités d'expertises

Comme mentionné dans l'introduction de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de m'impliquer dans les activités d'expertises de l'équipe BDPEE sans que cela nuise à mon projet principal focalisé sur *Blastocystis* sp. Ces activités d'expertises ont été réalisées en collaboration et à la demande de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (B. Polack), de VetAgro Sup de Lyon (C. Profizi, L. Zenner) et des sociétés Royal Canin (A. Grellet) et GD – Animal Health aux Pays-Bas (W.J.M. Landman, R.J. Molenaar, H.M.J.F. van der Heijden). Elles ont porté sur l'identification moléculaire de protozoaires d'intérêt vétérinaire du groupe des trichomonadines chez les chats, les chiens et les poulets. Brièvement, mon implication dans ces études a été de rechercher par PCR les trichomonadines présentes dans les échantillons qui nous étaient envoyés puis d'identifier les espèces impliquées par analyse des séquences obtenues après séquençage direct ou clonage/séquençage des produits de PCR. Ces différentes collaborations ont été valorisées par 3 publications dans « *Veterinary Parasitology* » et « *Avian Pathology* ». Seuls les abstracts de ces publications sont présentés.

- Grellet A., Polack B., Feugier A., Boucraut-Baralon C., Grandjean D., Vandewynckel L., **Cian A.**, Meloni D., Viscogliosi E. 2013. Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. *Vet Parasitol* 197(3-4):418-426

### **Abstract**

The trichomonad species *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* were recently identified in the feces of dogs with diarrhea. However the prevalence and pathogenicity of these parasites in the canine population still remained poorly resolved. Therefore the aim of the present study was (1) to determine the prevalence of trichomonads infecting puppies living in French breeding kennels, (2) to confirm the predominance of *P. hominis* in dogs, (3) to investigate the genetic diversity of *P. hominis* isolates identified in the French canine population and (4) to evaluate the risk factors for infection by *P. hominis* and the influence of the parasite on feces consistency. A total of 215 both diarrheic and non-diarrheic puppies from 25 French breeding kennels were included in this epidemiological survey. Fecal samples from each puppy were examined for 6 gastrointestinal pathogens: parvovirus type 2 (CPV2), coronavirus, *Toxocara canis*, *Cystoisospora ohioensis*-complex, *Cystoisospora canis*, and *Giardia intestinalis*. A part of each collected stool was also tested

## ANNEXES

for the presence of motile trichomonads by microscopy after culturing. The prevalence of trichomonad infection was 15.8% (34/215) among puppies and 20% (5/25) among breeding kennels. DNA from 26 of the 34 positive samples was successfully amplified using a trichomonad-specific primer pair. Analysis of the sequences of PCR products indicated that *P. hominis* was the only trichomonad infecting the canine population. All the puppies infected with *P. hominis* belonged to large breed dogs. Moreover, puppies from large breeding kennels, excreting a high level of *G. intestinalis* and/or excreting a high level of *C. canis* oocysts showed a higher probability of being positive for *P. hominis* infection. Univariate analysis also revealed an increased risk for *P. hominis* infection in puppies with abnormal feces. However, in a multivariate analysis, CPV2 was the only gastrointestinal pathogen associated with abnormal feces. Since enteropathogens were commonly found in dogs infected by *P. hominis*, the pathogenic potential of this trichomonad species remained uncertain and has to be further evaluated by experimental infection studies.

- Profizi C., Cian A., Meloni D., Hugonnard M., Lambert V., Groud K., Gagnon AC., Viscogliosi E., Zenner L. 2013. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. *Vet Parasitol* 196(1-2):50-55

### Abstract

Recently, *Tritrichomonas foetus*, the known etiologic agent of bovine trichomonosis was identified in domestic cats in many countries around the world. In felids, this parasite would be a significant cause of large-bowel diarrhoea. Therefore the aim of the present study was to determine for the first time the prevalence of *T. foetus* infection in French catteries. In this epidemiological survey, rectal swabs from 140 cats participating in three international shows were tested for the presence of motile parasites by microscopy after culturing. The prevalence of *T. foetus* infection was 14.3% among cats (20/140) and 15.9% among catteries (18/117). These values were similar to those previously obtained in other European countries. Except for the age, no significant associations were found between the presence of *T. foetus* and various risk factors of infection such as the size of the cattery, the type of food, or the vicinity of a dog. Internal transcribed region of the ribosomal DNA unit was sequenced from the 20 *T. foetus* isolates identified in this study. They exhibited 100% identity and are homologous with other sequences of strains isolated from domestic cats in other countries.

## ANNEXES

- Landman W.J., Molenaar R.J., **Cian A.**, van der Heijden H.M., Viscogliosi E. 2016. Granuloma disease in flocks of productive layers caused by *Tetratrichomonas gallinarum*. *Avian Pathol* 45(4):465-477

### **Abstract**

In 2013, seven outbreaks of granuloma disease in Dutch flocks of laying chickens occurred. These outbreaks were characterized by increased mortality and high incidence of granulomas, mainly in ceca (340/408 hens = 83%) and livers (69/408 hens = 17%). Mortality started to increase between 21 and 35 weeks of age and reached 9.2% to 12.4% in periods ranging from nine to 48 weeks. Some flocks also showed decreased egg production and/or loss of mean egg weight. All affected flocks were linked to one rearing farm, which therefore seemed to be the source of the disease. However, no signs of disease had been observed at this rearing farm. Sentinel hens placed in one of the affected flocks to determine whether the disease had an infectious nature developed granulomas identical to those seen in the outbreaks. Next, by fulfilling Koch's postulates it was shown that *Tetratrichomonas gallinarum* was the etiological agent of the granuloma disease. The condition was reproduced in mature SPF White Leghorn hens by inoculation via both, an artificial and a natural route with a well-defined axenic *T. gallinarum* isolate obtained from one of the affected flocks. Other causes of granuloma disease were excluded.

## ANNEXES

**Annexe II** : Questionnaire mis en place pour la recherche de *Blastocystis* sp. dans la population générale au Liban

### Recherche de *Blastocystis* sp à visée scientifique

Nom de laboratoire: .....

PBR : .....

1. Nom, prénom du patient: .....
2. Age: .....
3. Sexe: M  F
4. Profession: .....
5. Résidence: .....
6. Le patient est-il en contact avec des animaux (de compagnie ou de ferme): Oui  Non
7. Le patient a-t-il voyagé hors du Liban (< 1ans)? Oui  Non

Si oui, quand et dans quel pays? .....

8. Nature de l'eau consommée : Puit  Robinets  Minérale  Autres.....
9. Le patient est-il immunodéprimé? Oui  Non

Si oui, quelle est la cause?

- VIH
- Immunosuppresseurs
- Autres

10. Parmi les symptômes suivants, lesquels sont présents?

- Douleurs abdominales
- Constipation
- Rash cutané
- Diarrhée
- Douleur articulaire
- Aucun

Autres:.....

11. S'il est diarrhéique, quel est le nombre des selles émis par jour ?
12. Le patient souffre-t-il d'une colopathie fonctionnelle (Syndrome de l'intestin irritable) ?  
 Oui  Non
13. Quand les symptômes ont-ils commencés :
14. Le patient présente-t-il d'autres pathologies/parasitoses (amibes, *Giardia*) pouvant entraîner cette symptomatologie : Non  Oui  lequel : .....

## ANNEXES

**Annexe III** : Questionnaire mis en place pour l'étude menée chez les écoliers au Liban et portant sur plusieurs parasites intestinaux

<h3 style="margin: 0;">Questionnaire relatif à la recherche des parasites chez les enfants au Liban</h3>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Age	Nom
Adresse	Téléphone du contact
Nombre de chambre dans l'appartement	Nombre des membres de la famille vivant dans l'appartement
Niveau d'éducation des parents	Les parents sont-ils propriétaires ou locataires ?

- Sexe :  Male  Femelle
- Contact avec les animaux dans l'appartement (type de l'animal) : .....
- Voyages récents (<30 jours) et lieu : .....
- Nature de l'eau consommée  robinet  puits  robinet filtré  minéral
- Est-ce qu'il mange des légumes :  rarement  quelque fois  1 fois/semaine  fréquemment
- Est-ce qu'il mange à l'extérieur :  rarement  quelque fois  1 fois/semaine  fréquemment
- Le patient souffre-t-il de troubles digestifs ?  Oui  Non  
Si oui, préciser les symptômes :  Fièvre  Douleur abdominale  Diarrhée  
 Céphalée  Douleur articulaire  Vomissement  Malaise  Constipation  
 Sang dans les selles
- L'enfant a-t-il consulté son médecin ?  Oui  Non
- L'enfant a-t-il fait des examens coprologiques ?  Oui  Non  
Si oui, préciser le résultat de l'examen : .....
- L'enfant était-il sous traitement durant les six derniers mois :  
Si oui, préciser les noms des médicaments : .....
- Le traitement pris est conseillé par :  Médecin  Pharmacien  Domicile  
 Voisins  Proches
- Est-ce que l'enfant a subi une hospitalisation durant la dernière année :  
Si oui, préciser le motif et la durée d'hospitalisation : .....
- Le patient a-t-il des membres de sa familles souffrant des troubles digestives ?  
Si oui, préciser les symptômes :  Fièvre  Douleur abdominale  Diarrhée  
 Céphalée  Douleur articulaire  Vomissement  Malaise  Constipation  
 Sang dans les selles

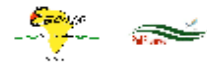
Information sur l'échantillon (Réservé à l'enquêteur)

- Nom de l'école (code) : .....
- Date du prélèvement :
- Nature du prélèvement (selles) :  Dures  Molles  Liquides

# ANNEXES

## Annexe IV : Questionnaire mis en place pour la recherche de *Blastocystis* sp. au Sénégal

Identifiant : _____ P3V
----------------------------



### **Questionnaire enfant** **(P3V : Octobre 2011-Etude Schisto-VAN)**

Village  A  F  N    Date \_\_\_/oct/2011    Heure : .....    Enquêteur .....    T.ext .....°C  
 Prénom .....    Nom .....     Fille     Garçon  
 Père .....    Mère .....    Ecole, Classe : .....  
 Date de Naissance ...../...../.....    Âge .....    Température auriculaire \_\_\_ , \_\_\_ °C  
 Qui a répondu ? .....    Lien à l'enfant .....    N° concession .....    Chef .....  
 Liens de parenté avec d'autres enfants de l'étude ? .....  
 Partage l'habitation avec certains de ces enfants ?  oui  non    lesquels ? .....

	Oui	Non	Quand	Durée	Traitement
Fièvre récente					
Paludisme récent					
Toux de plus que 3 semaines					
Diarrhée					
Vomissements					
Autres maladies					

Hématurie ?  oui  non    Maux de ventre ?  oui  non    Douleurs à la miction ?  oui  non  
 Baignade régulière dans le fleuve ou canaux d'irrigation  oui  non    Fréquence ? .....  
 Heure ? .....    Durée ? .....    Traitement au PZQ ?  oui  non    Quand ? .....  
 Remarques ? .....  
 Voyage ?  oui  non    Où ? .....    Durée ? .....    Il y a combien de temps ? .....

Observations relatives aux urines : .....

Observations relatives aux selles : .....

Taux d'hémoglobine :  g/dl    Taille 1 : ..... (cm)    Taille 2 : ..... (cm)    Poids : ..... (Kg)

Carnet de vaccination :  oui  oui mais manquant  non    Complètement vacciné  oui  non

BCG .....    Penta 1 .....    Penta 2 .....    Penta 3 .....    Var-VAA .....

Observations : .....

.....



## ANNEXES

### Annexe VI :

Avant de mener notre étude sur l'analyse comparative du microbiote intestinal de patients infectés ou non par *Blastocystis* sp. publiée dans « Scientific Reports » (**Article 7**), j'ai eu l'occasion de participer à des travaux coordonnés par nos collègues clermontois visant à déterminer les variations des proportions de 8 groupes bactériens du microbiote intestinal déterminées par PCR quantitative dans une cohorte d'individus sains sans pathologie digestive ou atteints du SII et infectés ou non par *Blastocystis* sp. Mon implication dans cette étude ayant été mineure, cette étude n'apparaît donc qu'en Annexe tout en étant discutée dans mon mémoire dans le chapitre « *Blastocystis* sp. et microbiote intestinal ». Seul l'abstract de cette publication est présenté.

✓ Nourrisson C., Scanzi J., Pereira B., NkoudMongo C., Wawrzyniak I., **Cian A.**, Viscogliosi E., Livrelli V., Delbac F., Dapoigny M., Poirier P. 2014. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparison between patients with Irritable Bowel Syndrome and asymptomatic subjects. *PLoS ONE* 9(11):e111868

#### **Abstract**

*Blastocystis* is a protistan parasite living in the digestive tract of many animals, including humans. This highly prevalent intestinal parasite is suspected to be linked to Irritable Bowel Syndrome (IBS), a chronic functional bowel disorder. Here, we first compared the prevalence of *Blastocystis* among 56 IBS patients (40 IBS with constipation (IBS-C), 9 IBS with diarrhea (IBS-D), 4 mixed IBS (IBS-M) and 3 untyped IBS (IBS-U) according to the Rome III criteria) and 56 control (*i.e.* without any diagnosed chronic or acute gastrointestinal disorder) subjects. The highest prevalence of *Blastocystis* spp. was observed in the IBS group, but was only statistically significant in men (36.8% in the IBS group *versus* 4.8% in the control group). We then conducted a meta-analysis including epidemiological studies attempting to determine whether *Blastocystis* carriage could be linked to IBS, and highlighted that IBS patients had a relative risk of 2.34 to be infected by *Blastocystis* when compared to non-IBS subjects. We also looked for *Dientamoeba fragilis*, which is often associated with IBS, and identified this parasite only in some IBS patients (n=6/56). Several studies provided evidence for a major role of the gut microbiota in the pathophysiology of IBS. Thus, we investigated the possible impact of *Blastocystis* carriage on the enteric bacterial



## ANNEXES



community through quantification of 8 major bacterial groups from the enteric flora. Our data indicated that men with IBS-C had a significant decrease in *Bifidobacterium* sp. when infected by *Blastocystis*. Interestingly, in control subjects (*i.e.* without any gastrointestinal disorder) positive for *Blastocystis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, which is known for its anti-inflammatory properties, was significantly decreased in men. Our results support the hypothesis that *Blastocystis* might be linked to the pathophysiology of IBS-C and intestinal flora imbalance.

## ANNEXES

### Annexe VII:

Parmi les facteurs de virulence identifiés chez *Blastocystis* sp. figurent les peptidases et en particulier les protéases à cystéine telles que la cathepsine et la légumaine préalablement caractérisées dans le surnageant de culture du parasite de ST7 par Wawrzyniak et al. (2012). Ces mêmes protéases ont fait l'objet d'une analyse complémentaire lors de ma thèse dans le cadre de travaux coordonnés par nos collègues clermontois. Cette étude montre clairement le rôle *in vitro* de la cathepsine préalablement activée par la légumaine sur l'épithélium intestinal. Mon implication dans cette étude ayant été mineure, cette étude n'apparaît donc qu'en Annexe tout en étant discutée dans mon mémoire dans le chapitre « Apports de la génomique comparative ». Seul l'abstract de cette publication est présenté.

✓ Nourrisson C., Wawrzyniak I., **Cian A.**, Livrelli V., Viscogliosi E., Delbac F., Poirier P. 2016. On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology* sous presse (DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182016001396>)

### **Abstract**

*Blastocystis* spp. pathogenic potential remains unclear as these anaerobic parasitic protozoa are frequently isolated from stools of both symptomatic and asymptomatic subjects. *In silico* analysis of the whole genome sequence of *Blastocystis* subtype 7 revealed the presence of numerous proteolytic enzymes including cysteine proteases predicted to be secreted. To assess the potential impact of proteases on intestinal cells and gut function, we focused our study on two cysteine proteases, a legumain and a cathepsin B, which were previously identified in *Blastocystis* subtype 7 culture supernatants. Both cysteine proteases were produced as active recombinant proteins. Activation of the recombinant legumain was shown to be autocatalytic and triggered by acidic pH, whereas proteolytic activity of the recombinant cathepsin B was only recorded after co-incubation with the legumain. We then measured the diffusion of 4-kDa FITC-labeled dextran across Caco-2 cell monolayers following exposition to either *Blastocystis* culture supernatants or each recombinant protease. Both *Blastocystis* culture supernatants and recombinant activated cathepsin B induced an increase of Caco-2 cell monolayer permeability, and this effect was significantly inhibited by E-64, a specific cysteine protease inhibitor. Our results suggest that cathepsin B might play a role in pathogenesis of *Blastocystis* by increasing intestinal cell permeability.