



**HAL**  
open science

# Mise en place d'un modèle animal d'infection par *Blastocystis*: répercussion sur la sensibilité colique, le comportement et le microbiote intestinal

Manon Defaye

## ► To cite this version:

Manon Defaye. Mise en place d'un modèle animal d'infection par *Blastocystis*: répercussion sur la sensibilité colique, le comportement et le microbiote intestinal. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2018. Français. NNT : 2018CLFAS019 . tel-02402188v1

**HAL Id: tel-02402188**

**<https://theses.hal.science/tel-02402188v1>**

Submitted on 10 Dec 2019 (v1), last revised 10 Dec 2019 (v2)

**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.

ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

## Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne  
Pour l'obtention du grade de docteur  
(Décret du 5 juillet 1984)  
Spécialité Neurogastroentérologie

Soutenue le 07 décembre 2018

**Manon DEFAYE**

---

# Mise en place d'un modèle animal d'infection par *Blastocystis*: Répercussions sur la sensibilité colique, le comportement et le microbiote intestinal

---

### Directeur de thèse

Pr. Frédéric DELBAC      Université Clermont Auvergne, LMGE, CNRS U6023, Clermont-Ferrand

### Membres

Dr. Mathilde BONNET      Université Clermont Auvergne, M2iSh, Inserm/INRA U1071, Clermont-Ferrand  
Dr. Pauline JOUET      Service de Gastroentérologie, Hôpital Ambroise-Paré, Boulogne Billancourt  
Dr. Gilles DIETRICH      Université Paul Sabatier, IRSD, Inserm/CNRS U1220, Toulouse

### Rapporteurs

Pr. Nathalie KAPEL      Service de coprologie fonctionnelle, Hôpital la Pitié-Salpêtrière, Paris  
Dr. Christophe ALTIER      Université de Calgary, Réseau de Recherche sur l'Inflammation, Calgary

Laboratoire Micro-organismes : Génome et Environnement UMR6023 CNRS/UCA  
Equipe Interaction Hôtes-Parasites  
Campus Universitaire des Cèzeaux, 1 Impasse Amélie Murat, 63178 AUBIERE

&

NeuroDol UMR1107 Inserm/UCA  
Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur  
Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 CLERMONT-FERRAND

*A mes parents*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, le Professeur Nathalie Kapel ainsi que le Docteur Christophe Altier d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. Merci également aux Docteurs Pauline Jouet, Mathilde Bonnet et Gilles Dietrich d'avoir accepté de juger ce travail en assistant à ma présentation. Je tiens à remercier tout particulièrement Gilles qui fut mon encadrant de Master 2 et qui m'a initiée aux joies de l'intestin. Merci de m'avoir suivie tout au long de ma thèse en assistant à mes différents comités de thèse et merci également pour ton expertise et ton soutien! Je tiens à remercier Christophe Altier qui dans les prochains mois va m'accueillir dans son équipe. Merci de m'accorder votre confiance pour ces prochaines années j'espère ne pas vous décevoir! Merci à ma maman de thèse Mathilde qui m'a épaulé dans les bons comme dans les mauvais moments ces trois dernières années. J'espère que tu me rendras visite au Canada!

Je remercie le Docteur Téléphore Sime-Ngando et les Professeurs Alain Eschalier et Nicolas Barnich de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire respectif le LMGE, NeuroDol et le M2iSH et de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans des conditions optimales. Merci à toi Nicolas d'avoir participé au suivi du projet durant les différentes réunions MHIB.

Je souhaite également adresser mes remerciements au Professeur Valérie Livrelli, et aux Docteurs Delphine Boucher et Malvyne Rolli-Derkinderen qui ont suivi l'évolution de mes travaux au cours des différents comités de thèse et qui ont su m'apporter leurs conseils.

Je souhaite remercier Denis Ardid qui me suit depuis quelques années déjà. Mes réponses à l'oral de pharmaco à l'IUT n'ont pas du te marquer pour que tu veuilles me recruter en thèse! Rassure toi je pense avoir évolué scientifiquement avec ton aide et celle de tous mes encadrants. Merci d'avoir pris le temps de corriger cette thèse et de tes conseils avisés.

Je tiens évidemment à remercier mes directeurs de thèse! Les Freds! Merci à Frédéric Delbac et Frédéric Carvalho de m'avoir accordé leur confiance. Malgré de nombreuses fonctions Fred D tu as été toujours présent et disponible. Tu as été plus que pertinent dans tous tes conseils et très compréhensif dans certaines situations. Merci à toi Fred C pour ta disponibilité à des horaires imbattables! Tu m'as laissé beaucoup d'autonomie sans pour autant me laisser en difficulté. Je te remercie encore pour le taille-crayon.

Un grand merci à Philippe Poirier qui m'a encadrée chaque jour de cette thèse!!! Merci de m'avoir supportée ces trois dernières années. Tu m'as fait évoluer scientifiquement et tu as été plus que présent durant cette thèse malgré ton poste universitaire et hospitalier. J'espère avoir été à la hauteur de tes espérances!

Merci à la Team Viscérale! Merci à Agathe Gelot de m'avoir apporté son soutien durant cette thèse. Merci à toi Mathieu pour ton implication dans ce projet, de m'avoir tout appris du

## Remerciements

nerf-colon, au moment où j'écris ces remerciements j'espère enregistrer une fibre d'ici peu! Merci à toi Ludivine pour ton oreille attentive et pour tous ces moments passés à tes côtés je te souhaite tout le bonheur que tu mérites et ça sera un petit garçon j'en suis sûre! Merci à Amandine ou Ama, ton départ a été difficile, tu étais un repère et une source d'inspiration. Mille mercis pour tout ce que tu as pu m'apporter dans le travail mais également à l'extérieur. Merci à mon binôme Elo, nous sommes arrivées ensemble sur le projet MHIB et nous soutenons notre thèse à 4 jours d'intervalle...si c'est pas beau! Surtout prend du temps pour toi et ressource toi dans ta Bretagne! Merci à Geoffroy pour sa bonne humeur et nos discussions, en espérant que tu auras ton concours! Merci à Maëva pour son enthousiasme et son aide durant ces derniers mois. Garde courage, tu vas bien attaquer un jour!

Merci à la Team Blasto! Merci à toi Ivan pour ton aide, ton expertise et nos commérages. Merci à toi Céline, sans toi le projet n'aurait pas pu avancer si vite, ce modèle nous l'avons fait à deux avec nos compétences respectives, j'espère que tu le feras perdurer! Merci également à Vivi pour son aide si précieuse et sa bonne humeur! Nos petites discussions vont me manquer! Merci également à Marie-Laure et Bernard d'avoir participé à ce projet. Je n'oublie pas Hicham qui fut présent à mon entretien et qui a su convaincre de me prendre en thèse, je ne sais pas si au final mes chefs vont te remercier!

Merci à Fabien Marchand pour son honnêteté et ses conseils pertinents. Merci de ton aide pour l'étude du comportement et surtout ne perd plus la clé éthovision!

Merci à Stéphane Lolignier pour ses conseils sur les expérimentations et la résolution de mes figures! N'oublie pas la fac ferme à 00h23.

Merci à notre petite fée Mireille sans qui les conditions de travail ne seraient pas ce qu'elles sont. Merci pour ta gentillesse et ta générosité!

Merci à toi Lauriane pour ton optimisme qui m'épatera toujours. Tu as été à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de rire à mes tours de magies et surtout d'approuver mes calculs!

Merci à Amélie, ma complice, avec qui j'ai partagé de super moments aussi bien dans le travail qu'en dehors. Tu as toujours le sourire et j'espère que tu continueras à le garder. Je crois qu'il y a un laboratoire à Edmonton sur la SEP bon d'accord pas de stress oxydant mais c'est déjà ça!

Merci à Julie, pour nos séances de mots fléchés pour les nuls, pour nos pauses crêpes et j'en passe! J'espère être là pour la naissance de ce petit bout! Et encore désolée pour votre poisson...

## Remerciements

Merci aux deux naines! Mélissa et Améline avec qui j'ai passé un séjour inoubliable au Portugal. Je vous souhaite tout plein de bonheur pour la suite et notamment une belle thèse! Je vais tellement regretter de ne plus faire les courses avec vous...

Merci à Elodie P pour sa bonne humeur et nos petits moments shopping. J'espère que la vie lilloise te convient. Plein de bonheur à toi et Jager!

Merci à Syssou...enfin non j'ai la floume! En tout cas je ne te remercie pas pour tous ces bleus! Pa Bô !

Merci à PY, pour qui je l'espère Word n'a plus aucun secret... ou presque.

Merci à Laurianne, pour ton soutien et l'intense travail fournit au Berthom. Prépare le canapé j'arrive dans le sud!

Merci à Jérémy et Lucie pour m'avoir accueillie dans le cercle très select des microbiologistes de l'IUT. J'ai passé de très bons moments à vos côtés durant tous ces TPs, merci de votre soutien.

Je tiens à remercier tout particulièrement Charline et Lilian mes encadrants de stage de M1 et de M2 respectivement. Merci à toi Charline d'avoir su trouver les mots pour me permettre d'avancer dans ce moment difficile, tu as été déterminante dans mon cursus. Merci à toi Lilian de m'avoir tout enseigné, de m'avoir transmis ta passion et de m'avoir épaulé également dans ma recherche de post doc. J'espère un jour exceller dans la recherche comme toi actuellement.

Ce projet faisant intervenir trois laboratoires partenaires, j'ai un certain nombre de personnes à remercier personnellement mais afin d'éviter que cette partie remerciements ne soit plus longue que ma thèse, je vais faire court! Je tiens à remercier tous les membres et anciens membres du laboratoire NeuroDol, LMGE et M2iSH pour leur aide, leur soutien et d'avoir fait en sorte que ma thèse se soit passée dans des conditions optimales. Merci à tous!

Merci à Aurélie et Gaëlle, pour tous les moments passés ensemble depuis de longues années maintenant. Merci pour votre soutien et d'avoir compris les sacrifices que cette thèse m'a demandé. Merci à vous, vous êtes les meilleures!

Enfin un immense merci à ma famille et surtout à mes parents qui m'ont toujours soutenue malgré mon caractère parfois difficile. Vous m'avez permis de réaliser mes études sereinement et vous m'avez poussé à toujours faire de mon mieux. Si j'en suis ici c'est bien grâce à vous.

## Résumé

Les douleurs abdominales chroniques, souvent associées à une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), sont l'un des symptômes majeurs constatés lors du syndrome de l'intestin irritable (SII). Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle touchant environ 11% de la population mondiale et altérant significativement la qualité de vie des patients. L'étiologie multifactorielle de cette pathologie rend la physiopathologie complexe. Les gastroentérites infectieuses ont été décrites comme l'un des facteurs de risque dans le développement du SII-post-infectieux (SII-PI). Le SII-PI survient en effet dans 4 à 31% des cas suite à une gastroentérite aiguë d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. Ces infections peuvent avoir de nombreuses répercussions et en particulier sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, le système immunitaire ou encore sur le microbiote intestinal. Par ailleurs, suite à une infection parasitaire, le risque de développer un SII est de 40% contre seulement 14% suite à une infection bactérienne.

*Blastocystis* est le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme. Néanmoins, malgré de récentes études épidémiologiques rapportant une plus forte prévalence de ce parasite chez les patients atteints de SII, son rôle en santé humaine reste débattu. De plus, d'autres études rapportent que les individus porteurs de ce parasite présentent des douleurs abdominales et sont atteints d'une dysbiose intestinale. Actuellement, l'absence d'un modèle animal d'infection par *Blastocystis* reproductible ne permet pas d'étudier les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection et donc d'explorer la contribution éventuelle de ce parasite dans le SII.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient tout d'abord de mettre en place un modèle murin d'infection expérimentale par *Blastocystis* pour dans un deuxième temps évaluer si ce parasite est capable d'induire une HSVC et une dysbiose intestinale avec l'objectif d'établir un nouveau modèle de SII d'origine infectieuse chez le rat.

Pour répondre au premier objectif, le pouvoir infectieux de différents sous-types et différentes formes du parasite (formes vacuolaires ou kystes), isolés de cultures axéniques ou purifiés à partir de selles de patients et d'animaux a été évalué chez des animaux de laboratoire (rats et souris). Nous avons ainsi réussi à établir un modèle reproductible d'infection chronique par *Blastocystis* chez le rat de laboratoire à l'aide de kystes purifiés à partir de selles humaines.

L'utilisation de ce modèle *in vivo*, nous a permis de mettre en évidence que le sous-type 4 (ST4) de *Blastocystis* induit une HSVC sans origine inflammatoire chez les rats expérimentalement infectés. De plus, les animaux développent un comportement type anxio-dépressif corrélé à l'HSVC. La dysbiose intestinale associée à l'infection se caractérise par une augmentation de la richesse bactérienne et une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Par ailleurs, nous avons corrélé l'HSVC à l'augmentation de l'abondance relative du genre *Bacteroides* et la diminution de l'abondance relative de la famille des *Clostridiaceae*, bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte (AGCC). Une diminution des taux d'AGCC fécaux a d'ailleurs été constatée chez les rats infectés. De plus, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité de protéases à sérine dans les fèces des animaux infectés pouvant expliquer l'HSVC.

Ces données suggèrent qu'une infection gastro-intestinale par *Blastocystis* serait associée à une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) et à un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose). Ainsi, ce nouveau modèle d'infection pourrait être un bon modèle de SII d'origine infectieuse et pourrait donc contribuer à un meilleur diagnostic et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies chroniques de l'intestin chez certains individus.



## Abstract

Chronic abdominal pain often associated with colonic hypersensitivity (CHS) is one of the major symptoms of irritable bowel syndrome (IBS). IBS is a functional chronic disorder affecting ~11% of worldwide population and disturbing patients' quality of life. Etiology is multifactorial and thus pathophysiology is complex and remains poorly understood. Infectious gastroenteritis has been described as one of the risk factors for development of post-infectious IBS (PI-IBS). PI-IBS can occur in 4-31% of patients following acute gastroenteritis of bacterial, viral or parasitic origin. Numerous studies support a role for pathogen-mediated modifications in the resident intestinal microbiota, epithelial barrier integrity and immune activation in PI-IBS. Interestingly, the risk of IBS is highest with protozoal enteritis, with ~40% of individuals developing IBS against ~14% following bacterial infection.

*Blastocystis* is the most common intestinal parasite found in human intestinal tract. Nevertheless, clinical relevance remains controversial, despite recent epidemiological studies showing a higher prevalence of this parasite in IBS patients. Interestingly, studies report that individuals carrying *Blastocystis* display abdominal pain and intestinal dysbiosis. Currently, the lack of reproducible animal model of *Blastocystis* infection does not allow to study the pathological mechanisms related to infection and thus to explore the potential contribution of this parasite in IBS.

The aims of this study were first to develop a murine model of *Blastocystis* infection and then to investigate whether this parasite could lead to the development of intestinal dysbiosis associated CHS with the aim of developing a new PI-IBS rat model.

The first aim was to evaluate the infectivity of different parasitic subtypes and stages (vacuolar and cystic forms) isolated from axenic cultures or purified from human or animal feces, into laboratory animals (rats and mice). Interestingly, we succeeded in the development of a reproducible model of chronic infection by *Blastocystis* in laboratory rats using cysts purified from human stool.

Using this animal model, we found that *Blastocystis* ST4 induced non inflammatory CHS in infected rats. In addition infected rats developed anxiety- and depressive-like behavior correlated with CHS. Infection associated intestinal dysbiosis was characterized by increased bacterial richness and decreased *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio. Interestingly, we correlated CHS

with the increase in the relative abundance of genus *Bacteroides* and the decrease in the relative abundance of the family *Clostridiaceae*, some bacteria producing Short Chain Fatty Acids (SCFAs). Indeed, fecal SCFAs levels were decreased in infected rats. These decreases were correlated with the relative abundance of genus *Oscillospira* which was also described increased in *Blastocystis* individual carriers. In addition, we have demonstrated an increase in fecal serine protease activity in infected animals that may explain development of CHS.

These data suggest that a gastrointestinal infection with *Blastocystis* may be associated with the establishment of intestinal dysbiosis associated CHS. Thus, this new infectious model could be a good model of PI-IBS and could therefore contribute to a better diagnosis and development of new therapeutic strategies for chronic bowel diseases.

## Contributions scientifiques

### Publications :

- Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, I. Warwznyiak, V. Bonnin, M. Bonnet, N. Barnich, Denis Ardid, F. Delbac, F. Carvalho and P. Poirier  
Article en révision mineure au journal Plos One.

### Communications orales:

- Etudes des perturbations de l'homéostasie intestinale en cas d'infection par *Blastocystis*: Conséquences sur le comportement et le bien-être.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, I. Wawrznyiak, M-L Collin, V. Bonnin, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
14<sup>ème</sup> Rencontre des microbiologistes Clermontois, Clermont-Ferrand, France (2017)
- *Blastocystis*, un parasite intestinal: quel lien avec le Syndrome de l'Intestin Irritable ?  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrznyiak, V. Bonnin, J. Barbier, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
Journée Scientifique du Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), Clermont-Ferrand, France (2017)
- Etude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium*: conséquences sur le bien-être de l'hôte.  
E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrznyiak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. Carvalho  
Réunion du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG), Paris, France (2017)
- Etude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium*: conséquences sur le bien-être de l'hôte.  
E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrznyiak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. Carvalho  
15<sup>ème</sup> Rencontre des microbiologistes Clermontois, Clermont-Ferrand, France (2018)
- *Blastocystis* infection induces intestinal dysbiosis associated visceral hypersensitivity.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrznyiak, V. Bonnin, J. Barbier, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
14<sup>ème</sup> Symposium National du réseau français de recherche sur la douleur, Toulouse, France (2018)

- La dysbiose intestinale induite par *Citrobacter rodentium* conduit au développement d'une hypersensibilité viscérale colique à distance de l'infection.  
E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. Carvalho  
14ème Symposium National du réseau français de recherche sur la douleur, Toulouse, France (2018)
- Etude de la sensibilité viscérale et de la dysbiose associée lors d'une infection par un parasite intestinal, *Blastocystis*.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
Réunion du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG), Paris, France (2018)
- Rôle de la voie de l'il-22 sur les perturbations intestinales en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : conséquences sur le bien-être de l'hôte.  
M. Meynier, E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D Ardid, P. Poirier, J-M. Chatel, M. Bonnet, F. Carvalho  
Réunion du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG), Paris, France (2018)
- Etude de la sensibilité viscérale et de la dysbiose associée à une infection par *Blastocystis*.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
Congrès National de la Société Française d'Etude et Traitement de la douleur (SFETD), Lille, France (2018)
- Étude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : conséquences sur le bien-être de l'hôte.  
E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. Carvalho  
Congrès National de la Société Française d'Etude et Traitement de la douleur (SFETD), Lille, France (2018)

#### Communications affichées:

- *Citrobacter rodentium*-induced dysbiosis causes post-infectious visceral hypersensitivity and anxiety-like behavior.  
E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. Carvalho  
Targeting microbiota, Berlin, Allemagne (2017)
- Caractérisation des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par des micro-organismes pathogènes : conséquences sur le bien-être de l'hôte.  
E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. Carvalho  
Journées de l'Ecole Doctorale (JED), Clermont-Ferrand, France (2017)

- Altération de la sensibilité colique et du bien-être lors d'une infection par le parasite intestinal, *Blastocystis*.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, M-L. Collin, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD), Paris, France (2018)
- *Citrobacter rodentium* induit de l'hypersensibilité viscérale et un comportement anxieux à distance de l'infection  
E. Baudu, **M. Defaye**, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. Carvalho  
Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD), Paris, France (2018)
- *Blastocystis* infection alters gut homeostasis and behavior in rats.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
Digestive Disease Week (DDW), Washington, USA (2018)
- Altération de la sensibilité colique et du bien-être lors d'une infection par le parasite intestinal, *Blastocystis*.  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, M-L. Collin, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
Journées de l'Ecole Doctorale (JED), Clermont-Ferrand, France (2018)
- *Blastocystis* infection alters gut homeostasis and behavior in rats  
**M. Defaye**, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, M. Meleine, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, M-L. Collin, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. Carvalho et P. Poirier  
Federation of Neurogastroenterology and Motility (FNM), Amsterdam, Pays-Bas (2018)

### **Enseignement et encadrement:**

Enseignante contractuelle à l'UFR de Biologie (2016-2017): Travaux pratiques de Biochimie (64h)

Enseignante contractuelle à l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) (2017-2018): Travaux pratiques de Microbiologie (64h)

Encadrement de stages : Lucie MABRU (3<sup>ème</sup> année de Licence), Anaïs CUELHO, (2<sup>ème</sup> année de DUT), Elysa CROZAT (2<sup>ème</sup> année de DUT).

# Sommaire

Liste des abréviations	16
Liste des figures et tableaux	17
Préambule	19
Partie A : Revue Bibliographique	21
Chapitre 1: Le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII)	22
1. Généralités	22
2. Symptômes	22
3. Diagnostic	24
4. Epidémiologie	26
4.1. Prévalence	26
4.2. Etiologie	27
4.2.1. Sexe	27
4.2.2. Age	27
4.2.1. Génétique	27
4.2.2. Facteurs psychologiques	30
4.2.3. Alimentation	31
4.2.4. Infections gastro-intestinales	32
5. Traitements	33
5.1. Traitements pharmacologiques	33
5.1.1. Traitements de la douleur	33
5.1.2. Traitements des patients atteints de SII-C ( <b>Figure 5</b> )	34
5.1.3. Traitements des patients atteints de SII-D ( <b>Figure 6</b> )	35
5.2. Traitements non pharmacologiques	37
5.2.1. Nutritionnels	37
5.2.2. Modulation de la composition du microbiote intestinal	38
5.2.3. Méthodes alternatives	42

## Chapitre 2: Altération de l'axe cerveau/intestin/microbiote dans le SII 44

1. Perturbations centrales _____	44
1.1. Cognition _____	44
1.2. Comorbidités psychiatriques _____	45
1.3. Stress _____	46
2. Perturbations de l'homéostasie intestinale _____	47
2.2. Activation du système immunitaire _____	49
3. Perturbations du microbiote intestinal _____	52
3.1. Altérations de la composante bactérienne _____	53
3.1.1. Altérations de la composition _____	53
3.1.2. Altération du métabolome _____	54
3.2. Altérations de la composante microbienne eucaryote _____	56
3.2.1. Champignons _____	56
3.2.2. Protozoaires _____	57

## Chapitre 3: *Blastocystis*, un nouvel acteur dans le SII ? \_\_\_\_\_ 60

1. Taxonomie et diversité génétique _____	60
1.1. Taxonomie _____	60
1.2. Diversité génétique _____	61
2. Morphologie _____	62
2.1. Forme vacuolaire _____	62
2.2. Forme granulaire _____	62
2.3. Forme amiboïde _____	63
2.4. Forme kystique _____	63
3. Cycle parasitaire _____	64
4. Méthode de détection _____	65
4.1. Microscopie directe _____	65
4.2. Culture xénique des selles _____	66
4.4. Biologie moléculaire _____	67
4.5. Analyses sérologiques _____	67
5. Epidémiologie _____	68
5.1. Prévalence _____	68
5.2. Répartition des STs _____	68

6. Rôle en santé humaine	69
6.1. Blastocystose	70
6.2. <i>Blastocystis</i> et Syndrome de l'intestin irritable	71
6.3. <i>Blastocystis</i> et lésions cutanées	72
6.4. <i>Blastocystis</i> et patients immunodéprimés	72
6.5. <i>Blastocystis</i> et cancer	73
7. Pouvoir pathogène	73
7.1. Facteurs de virulence	73
7.2. Etudes <i>in vitro</i>	75
7.2.1. Perméabilité intestinale et apoptose	75
7.2.2. Effets immuno-modulateurs	76
7.2.3. Prolifération cellulaire	77
7.3. Etudes <i>in vivo</i>	78
7.3.1. Modèles d'infection	78
7.3.2. Effets biologiques	79
8. Traitements	81
<b>Chapitre 4: Objectifs</b>	<b>83</b>
<b>Partie B : Données expérimentales</b>	<b>84</b>
<b>Article 1: Efficient and reproducible experimental infections of rats with <i>Blastocystis</i> spp.</b>	<b>85</b>
<b>Article 2: <i>Blastocystis</i> infection induces intestinal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in animal model</b>	<b>113</b>
<b>Partie C : Discussion et perspectives</b>	<b>149</b>
<b>Mise en place d'un modèle d'infection chronique par <i>Blastocystis</i> chez le rat</b>	<b>150</b>
<b>Infection par <i>Blastocystis</i>: Modèle de SII d'origine infectieuse</b>	<b>154</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>165</b>
<b>Partie D : Annexe</b>	<b>166</b>
<b>Partie E : Références bibliographiques</b>	<b>166</b>



## Liste des abréviations

<b>5-HT:</b> 5-hydroxytryptamine (sérotonine)	<b>PAR:</b> <i>protease activated receptor</i>
<b>5-HTR:</b> récepteur à la sérotonine	<b>PBS:</b> <i>phosphate buffered saline</i>
<b>ACTH:</b> adrénocorticotrophine	<b>PI:</b> post-inoculation
<b>AGCC:</b> acide gras à chaînes courtes	<b>PKS:</b> polyketide synthase
<b>BDNF:</b> facteur neurotrophique dérivé du cerveau	<b>NLR:</b> <i>nod-like-receptor</i>
<b>CFU:</b> <i>colony forming unit</i>	<b>NRPS:</b> non ribosomal peptide synthase
<b>CHS:</b> colonic hypersensitivity	<b>SCFAs:</b> short chain fatty acids
<b>CRD:</b> <i>colorectal distension</i>	<b>SII:</b> syndrome de l'intestin irritable
<b>DSS:</b> dextran sodium sulfate	<b>SII-C:</b> syndrome de l'intestin irritable à prédominance de constipations
<b>ELISA:</b> <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	<b>SII-D:</b> syndrome de l'intestin irritable à prédominance de diarrhées
<b>EPM:</b> <i>elevated plus maze</i>	<b>SII-M:</b> syndrome de l'intestin irritable mixte
<b>FAP:</b> fibre afférente primaire	<b>SII-PI:</b> syndrome de l'intestin irritable post-infectieux
<b>FMT:</b> <i>fecal microbiota transplantation</i>	<b>SII-U:</b> syndrome de l'intestin irritable non classé
<b>FODMAPs:</b> oligosaccharides fermentescibles, disaccharides, monosaccharides et polyols	<b>ST:</b> sous-type
<b>FST:</b> <i>forced swimming test</i>	<b>Th:</b> <i>lymphocyte t helper</i>
<b>H<sub>2</sub>S:</b> sulfure d'hydrogène	<b>TLR:</b> <i>toll-like-receptor</i>
<b>HHS:</b> hypothalamo-hypophyso-surrénalien	<b>TMF:</b> transplantation de microbiote fécal
<b>HSVC:</b> hypersensibilité viscérale d'origine colique	<b>TNF:</b> <i>tumor necrosis factor</i>
<b>IBS:</b> irritable bowel syndrom	<b>VIH:</b> virus de l'immunodéficience humaine
<b>Ig:</b> immunoglobuline	<b>ZO-1:</b> <i>zonula occludens-1</i>
<b>IL:</b> interleukine	
<b>LPS:</b> lipopolysaccharides	
<b>MICI:</b> maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	
<b>MLO:</b> organites apparentés aux mitochondries	
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> <i>nuclear factor-kappa b</i>	

## Liste des figures et tableaux

<b>Figure 1:</b> Consistance des selles selon l'échelle de Bristol. ....	25
<b>Figure 2:</b> Procédure d'évaluation lors d'une suspicion de SII.....	25
<b>Figure 3:</b> Prévalence mondiale du SII. ....	26
<b>Figure 4:</b> Etiologie du Syndrome de l'Intestin Irritable (SII).....	27
<b>Figure 5:</b> Mécanismes d'action des molécules utilisées pour le traitement des patients atteints de SII-C.....	34
<b>Figure 6:</b> Mécanismes d'action des molécules utilisées pour le traitement des patients atteints de SII-D. ....	35
<b>Figure 7:</b> Mécanismes de maintien de l'homéostasie intestinale par les acides gras à chaîne courte (AGCC).....	54
<b>Figure 8:</b> Synthèse des mécanismes physiopathologiques du SII.....	59
<b>Figure 9:</b> Phylogénie des Straménopiles établie par comparaison des séquences du gène de l'ARNr 18S. ....	60
<b>Figure 10:</b> Cycle hypothétique de <i>Blastocystis</i> .....	64
<b>Figure 11:</b> Prévalence chez l'Homme des différents STs en fonction de la répartition géographique. ....	68
<b>Figure 12:</b> Molécules et schémas thérapeutiques ayant montré une efficacité dans le traitement de la blastocystose.....	81
<b>Figure 13:</b> Mécanismes physiopathologiques potentiels de <i>Blastocystis</i> d'après les données génomiques et expérimentales <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . ....	82
<b>Figure 14:</b> Method of cyst purification from human stools. ....	93
<b>Figure 15:</b> <i>Blastocystis</i> ST4 cysts purified from human stools.....	99
<b>Figure 16:</b> Colonic sections from <i>Blastocystis</i> ST4-infected rats.....	102
<b>Figure 17:</b> Flow chart of experimental protocol. ....	121
<b>Figure 18:</b> Quantification of inflammatory mediators and colonic hypersensitivity following infection with <i>Blastocystis</i> . ....	129

<b>Figure 19:</b> Behavior study of rats following infection with <i>Blastocystis</i> .....	130
<b>Figure 20:</b> Fecal microbiota variations associated to <i>Blastocystis</i> in rats. ....	131
<b>Figure 21:</b> Impact of microbiota modifications on fecal Short-Chain Fatty Acid (SCFA) levels. .....	132
<b>Figure 22:</b> Serine protease activity in feces of rats.....	132
<b>Figure 23:</b> L'infection par <i>Blastocystis</i> ne modifie la perméabilité intestinale. ....	156
<b>Figure 24:</b> L'inhibition des sérines protéases par le FUT-175 ne modifie pas la sensibilité colique des rats infectés. ....	159
<b>Figure 25:</b> Les rats ayant reçu le microbiote de rats infectés hypersensibles ne présentent pas d'hypersensibilité viscérale d'origine colique. ....	160
<b>Figure 26:</b> <i>Blastocystis</i> ST3 induit une hypersensibilité viscérale d'origine colique. ....	162
<b>Figure 27:</b> La co-infection <i>Blastocystis</i> ST4 et <i>Entamoeba coli</i> induit de l'hypersensibilité chez les rats infectés. ....	163
<b>Tableau 1:</b> Listes des études montrant une association entre <i>Blastocystis</i> et le microbiote intestinal. ....	70
<b>Tableau 2:</b> Liste des publications utilisant le rat comme modèle d'infection par <i>Blastocystis</i> . .	78
<b>Tableau 3:</b> Liste des publications utilisant la souris comme modèle d'infection par <i>Blastocystis</i> . .....	78
<b>Tableau 4:</b> Experimental infections of rats and mice with <i>Blastocystis</i> spp.....	99
<b>Tableau 5:</b> Kinetic of <i>Blastocystis</i> ST4 route through the intestinal tract. ....	99

## Préambule

L'homéostasie intestinale est un état d'interactions complexes entre le microbiote, la muqueuse et le système immunitaire. Toute modification de cet équilibre peut avoir des répercussions délétères chez l'hôte qui peuvent aller de pathologies fonctionnelles (syndrome de l'intestin irritable ou SII), ou inflammatoires (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou MICI) jusqu'au cancer colorectal. Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans cet équilibre, toute dysbiose (perturbation de cet équilibre) pouvant avoir des répercussions au niveau périphérique (intégrité de la muqueuse) mais également au niveau central notamment *via* l'axe cerveau/intestin. Cela peut se traduire par l'apparition d'une hypersensibilité à l'origine de douleurs abdominales, une inflammation et des comorbidités psychiatriques. Néanmoins, la place du microbiote dans la physiopathologie reste complexe puisque la dysbiose peut être une cause et/ou une conséquence de ces pathologies. Jusqu'à présent, les travaux menés sur ce sujet n'ont pas permis de répondre à cette interrogation.

C'est dans ce contexte qu'en 2015 une nouvelle thématique de recherche, innovante et fédératrice, sur le rôle du microbiote et de ses altérations dans l'homéostasie intestinale et de manière originale, de ses répercussions sur le « bien-être », a été initiée dans le cadre d'un appel à projet « thématique émergente » de la région Auvergne-Rhône-Alpes. Ce projet intitulé MHIB (Microbiote, Homéostasie Intestinale et Bien-être) fait intervenir trois unités de recherche du site clerontois: l'UMR1107 NeuroDol, l'UMR6023 LMGE et l'UMR1071 M2iSh. Trois axes de recherche ont été proposés:

1. L'étude des perturbations du « bien-être de l'animal » en cas de modifications du microbiote intestinal.
2. L'étude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par des organismes pathogènes bactériens ou parasitaires et les répercussions sur le microbiote intestinal et le « bien-être » de l'hôte.
3. L'étude de l'impact de probiotiques et de médicaments sur le « bien-être »

L'obtention de ce financement a permis la réalisation de deux thèses sur l'axe n°2. L'une de ces thèses portait sur un modèle d'infection par *Citrobacter rodentium* chez la souris (sujet de thèse d'Elodie Baudu) et impliquait les laboratoires M2iSh et NeuroDol. La deuxième thèse, dans laquelle je me suis engagée, s'est articulée sur la mise en place d'un modèle d'infection par

*Blastocystis* chez le rat. Cette thèse s'est réalisée sous la supervision du Professeur Frédéric Delbac (LMGE) et du Docteur Frédéric Carvalho (NeuroDol) et l'encadrement du Docteur Philippe Poirier (LMGE).

Malgré des modèles d'infection différents, ces deux thèses sont liées de par un objectif commun qui vise à étudier les perturbations de l'homéostasie intestinale et du microbiote en cas d'infections par des micro-organismes pathogènes et les répercussions sur le « bien-être ».

# Partie A : Revue Bibliographique



## Chapitre 1: Le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII)

---

### 1. Généralités

Le syndrome de l'intestin irritable (SII ou IBS pour Irritable Bowel Syndrome) est une colopathie chronique fonctionnelle touchant ~11% de la population avec une prédominance chez la femme et qui altère significativement la qualité de vie des patients (Enck *et al.*, 2016). Cette pathologie se caractérise par des douleurs abdominales chroniques associées à des troubles du transit en l'absence de modifications de la structure intestinale (Defrees et Bailey, 2017; Enck *et al.*, 2016a; Mayer *et al.*, 2015). Le diagnostic repose sur la caractérisation de symptômes permettant de déterminer les différents sous-types de SII (Schmulson et Drossman, 2017). Le SII est une pathologie multifactorielle dont la pathogénèse reste complexe et peu connue et pour laquelle aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour.

### 2. Symptômes

Les symptômes caractéristiques du SII sont des douleurs abdominales chroniques qui entraînent une diminution de la qualité de vie des patients et nécessitent, en fonction de leur sévérité, le recours aux soins médicaux (Spiegel *et al.*, 2009; Spiegel *et al.*, 2010; Drossman *et al.*, 2000). Ces douleurs abdominales, généralement observées après la prise alimentaire, sont associées à des changements de la consistance des selles et sont souvent soulagées par la défécation.

Les douleurs abdominales sont associées dans 20 à 90% des cas à de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (Gwee *et al.*, 2009; Kanazawa *et al.*, 2008; Mertz *et al.*, 1995; van der Veek *et al.*, 2008). L'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) se définit par une augmentation de la perception douloureuse suite à l'application d'un stimulus et se caractérise par deux composantes; l'hyperalgie, qui est une sensibilité excessive à un stimulus douloureux et l'allodynie qui est une réponse douloureuse à un stimulus normalement indolore (Barbara *et al.*, 2011; Greenwood-van Meerveld, 2007). Le concept d'HSVC a été proposé pour la première

fois par Ritchie *et al.*, qui ont montré que le gonflement d'un ballon inséré dans le colon provoque des douleurs chez 55% des patients souffrant de SII contre 6% chez les individus contrôles (Ritchie, 1973). Cette observation a été par la suite largement confirmée par différentes études (Mertz *et al.*, 1995; Whitehead *et al.*, 1990). Bien que les premières études se sont intéressées à l'HSVC, il faut noter que cette hypersensibilité a été également décrite au niveau de l'œsophage, de l'estomac et de l'intestin grêle (Accarino *et al.*, 1995; Trimble *et al.*, 1995; Zighelboim *et al.*, 1995). L'HSVC est en général corrélée à la sévérité des symptômes (Posserud *et al.*, 2007; van der Veek *et al.*, 2008).

La modification de la consistance et/ou de la fréquence des selles, les ballonnements ainsi que la présence de mucus dans les selles sont également des symptômes fréquemment retrouvés chez ces patients. Les ballonnements sont en effet rapportés chez 96% des patients atteints de SII (Longstreth *et al.*, 2006). Certains peuvent présenter d'autres manifestations gastro-intestinales telles qu'un reflux gastro-œsophagien, de la dysphagie (Longstreth *et al.*, 2006) ou des manifestations extra-digestives comme l'anxiété, la dépression, une fibromyalgie, une cystite interstitielle ou une fatigue chronique (Hershfield, 2005; Saha, 2014; Whitehead *et al.*, 2002; Whorwell *et al.*, 1986).

Chez les femmes, l'association de symptômes avec les menstruations rend le diagnostic plus complexe (Heitkemper *et al.*, 2003). Les dysménorrhées et les douleurs associées aux menstruations sont exacerbées chez les femmes atteintes de SII. De plus, une augmentation des ballonnements est constatée avant les menstruations (Heitkemper *et al.*, 2003).

Une échelle de scores a été établie afin d'évaluer la sévérité des symptômes et ainsi d'adapter les traitements. Chez 70% des patients les symptômes sont légers. Dans 25% des cas, les symptômes sont dits modérés et se traduisent par une intensité et une fréquence plus importante. Enfin, le SII est dit sévère lorsqu'il se traduit par des symptômes fréquents et intenses qui interfèrent avec les activités quotidiennes. Cette symptomatologie sévère concerne environ 5% des patients atteints par ce syndrome.



### 3. Diagnostic

Le diagnostic du SII est un diagnostic clinique car il n'existe actuellement aucun biomarqueur spécifique de ce syndrome. L'utilisation de tests complémentaires afin d'exclure les pathologies intestinales dites « organiques » (présentant des modifications de la structure de l'intestin) varie en fonction de la symptomatologie du patient (décrit à la fin de cette partie). Le dépistage et la prévention du SII ne sont applicables du fait de la diversité de l'étiologie.

Le diagnostic ne repose pas sur l'évaluation d'un seul symptôme mais sur une association de symptômes. Afin de standardiser le diagnostic, une classification basée sur les critères de Rome a été mise en place. Les critères de Rome ont été développés afin de classer les troubles fonctionnels gastro-intestinaux, comme le SII, en fonction des symptômes cliniques. La première version a été proposée dans les années 80, le SII se définissait alors grâce aux critères de Rome. Cette version n'a cessé d'évoluer au fil des années, la dernière étant la quatrième version parue en 2016 (Drossman, 2016). La version de 2006 (Rome III) (Drossman, 2006), définissait un patient atteint de SII s'il présentait des douleurs abdominales ou un inconfort digestif au moins trois jours durant les trois derniers mois avec l'apparition des symptômes au moins six mois avant le diagnostic et si les douleurs ou l'inconfort étaient associés à au moins deux des critères suivants :

- ❖ Amélioration à la défécation
- ❖ Survenue associée à une modification de la fréquence des selles
- ❖ Survenue associée à une modification de la consistance des selles

Cette dernière version a été modifiée en 2016 et plusieurs points ont évolué. Pour établir le diagnostic, on ne parle plus d'"inconfort" mais exclusivement de "douleur", la fréquence des douleurs est passée à au moins un jour par semaine, et la relation des douleurs et de la défécation est décrite différemment (on ne parle plus d'"amélioration" avec la défécation). Il faut noter que l'évolution des critères de Rome tend à diminuer la prévalence du SII puisque ces critères deviennent de plus en plus restrictifs (Vork *et al.*, 2018). Les critères de Rome IV sont désormais les suivant :

**« Un patient pourrait être atteint du SII s'il présente des douleurs abdominales récurrentes au moins une fois par semaine en moyenne durant les trois derniers avec l'apparition de symptômes au moins six mois avant le diagnostic ».**

De plus, l'existence de douleurs abdominales récurrentes doit être associée à au moins deux des critères suivants:

- ❖ La défécation
- ❖ Une modification dans la fréquence des selles
- ❖ Un changement de la consistance (apparence) des selles

La notion de consistance des selles, basée sur l'échelle de Bristol, permet de définir différents sous-types de SII (**Figure 1**): on distingue ainsi le SII à diarrhée prédominante (SII-D), à constipation prédominante (SII-C), des SII mixtes (SII-M) caractérisés par une alternance de diarrhée et de constipation et des sous-types dits « non classés » (SII-U). Le SII-D se traduit par des selles molles ou liquides de type 6 ou 7 dans plus de 25% des cas et des selles dures ou solides de type 1 ou 2 dans moins de 25% des cas. Le SII-C se définit par des selles dures ou solides de type 1 ou 2 dans plus de 25% des cas et des selles molles ou liquides de type 6 ou 7 dans moins de 25% des cas. Le SII-M se caractérise par des selles dures ou solides et des selles molles ou liquides dans plus de 25% des cas. L'absence d'anomalies de consistance de selles (selles « normales » de type 4 dans plus de 25% des cas) ne permet pas de définir un sous-type de SII, on parle alors de SII-U.

D'autres pathologies intestinales telles que les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), la maladie cœliaque, la colite microscopique, le cancer colorectal ou les infections gastro-intestinales présentent des symptômes proches de ceux du SII. L'apparition de signes cliniques d'alarmes (présence de sang dans les selles, anémie, amaigrissement...) fait l'objet d'investigations complémentaires afin d'éliminer ces pathologies dites « organiques » caractérisées par une modification de la structure intestinale (**Figure 2**). La recherche d'antécédents familiaux permet également d'affiner le diagnostic. Des bilans sanguins, le dosage de la protéine C réactive ou de la calprotectine fécale, un examen parasitologique des selles mais également une gastroscopie et/ou une coloscopie peuvent être réalisés afin d'exclure ce type de maladies (Defrees et Bailey, 2017).

Les comorbidités psychiatriques associées au SII telles que l'anxiété ou la dépression peuvent être également un moyen d'orienter le diagnostic.

## 4. Epidémiologie

### 4.1. Prévalence

La prévalence du SII varie entre 1.1% et 45% selon les études avec une moyenne de 11.2% (**Figure 3**) (Enck *et al.*, 2016a; Lovell et Ford, 2012). Cette prévalence est plus élevée dans les pays occidentaux et est de l'ordre de 10 à 15% en Europe, aux Etats-Unis et en Chine (Lacy *et al.*, 2016; Lovell et Ford, 2012). L'absence de données précises dans de nombreux pays africains et asiatiques s'explique par la difficulté à distinguer les cas de SII des cas de gastroentérites d'origine infectieuse, notamment dans les pays dont l'accès à la médication et à l'hygiène est limité (Gwee 2005).

Le SII se manifeste souvent dès la petite enfance. Par ailleurs cette pathologie est à prédominance féminine puisque le ratio homme/femme est de 1 pour 2 (Enck *et al.*, 2016a; Goodwin *et al.*, 2013; Lacy et Moreau, 2016; Lovell et Ford, 2012).

Actuellement, il y a peu de données concernant la prévalence des différents sous-types de SII. Les études réalisées estiment que le SII-M est largement représenté (chez ~40% des patients), que le SII D représente ~34%, le SII-C ~20% et enfin que le SII-U ne représente qu'une minorité des patients (~5%) (Engsbro *et al.*, 2012a; Vork *et al.*, 2018). Néanmoins, les sous-types de SII définis par la fréquence et la consistance des selles peuvent évoluer au cours du temps. En effet, le symptôme qui à la base était prédominant peut évoluer et conduire à une classification dans un nouveau sous-type (Olafsdottir *et al.*, 2010).

## 4.2. Etiologie

Malgré une certaine avancée dans le diagnostic, l'étiologie du SII est multifactorielle et donc très complexe. Des facteurs propres à l'hôte (sexe, âge, génétique), des facteurs psychologiques ou des facteurs environnementaux (alimentation et infections gastro-intestinales) peuvent être impliqués dans le développement de cette pathologie (**Figure 4**).

### 4.2.1. Sexe

La prévalence du SII est deux fois plus importante chez les femmes que chez les hommes (Adeniyi *et al.*, 2017; Lovell et Ford, 2012; Rajindrajith et Devanarayana, 2012). Cette différence s'expliquerait par la fluctuation des hormones ovariennes qui peuvent avoir un effet dans la genèse des symptômes (Chumpitazi *et al.*, 2017; Heitkemper *et al.*, 2003). Les hormones ovariennes peuvent avoir des répercussions sur différents mécanismes physiopathologiques du SII comme la modulation du transit, les douleurs abdominales, l'activation du système immunitaire ou encore l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) (Meleine et Matricon, 2014).

### 4.2.2. Age

La prévalence du SII ne varie pas en fonction de l'âge des patients. Par contre l'incidence du SII tend à diminuer avec l'âge (Goodwin *et al.*, 2013; Lovell et Ford, 2012). La rémission est en effet possible entre l'enfance et l'âge adulte (Goodwin *et al.*, 2013). Il a été également montré que la probabilité de développer un SII était plus faible après 50 ans. Néanmoins, il faut noter qu'il existe une forte hétérogénéité entre les études.

### 4.2.1. Génétique

Un tiers des patients atteints de SII possèdent des antécédents familiaux (Levy *et al.*, 2001). L'existence d'un parent au premier degré atteint de SII serait prédictive du développement de cette pathologie (Waehrens *et al.*, 2015). Les études réalisées chez des jumeaux ont conforté l'idée d'une composante héréditaire dans l'apparition d'un SII. En effet, une plus forte prévalence de SII a été observée chez les jumeaux homozygotes par rapport aux jumeaux dizygotes (Bengtson *et al.*, 2006; Lembo *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2001). A ce jour, au moins cinq

études suggèrent que la composante héréditaire expliquerait 22 à 57% des cas de SII (Saito et Talley, 2008). De plus, une croissance fœtale restreinte dans le cas de jumeaux (poids de naissance < 2.5kg) serait un facteur de risque dans le cas du SII et des comorbidités associées (Bengtson *et al.*, 2015).

Par ailleurs, de nombreux facteurs génétiques de prédisposition ont été proposés mais leur implication dans la genèse de la pathologie est encore débattue. Ainsi, certains polymorphismes génétiques associés au SII ont été répertoriés :

❖ *Sérotonine.*

L'altération du système sérotoninergique a été largement étudiée dans la genèse des symptômes du SII. Ainsi différents polymorphismes dans le gène codant le transporteur de la sérotonine SLC6A4 (*solute carrier family 6 member 4*) ont été associés positivement au SII de type D et de type C (Choi *et al.*, 2014; Van Kerkhoven *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012; Niesler *et al.*, 2010; Saito, 2008). Ces polymorphismes génétiques ont pour conséquence de réduire la recapture de la sérotonine conduisant à l'augmentation du taux de sérotonine chez les patients SII (Kumar *et al.*, 2012). De plus, un polymorphisme génétique a été associé au développement d'altérations centrales telles que l'exacerbation du signal douloureux ou encore l'apparition de comorbidités comme l'anxiété et/ou la dépression (Camilleri *et al.*, 2008; Jarrett *et al.*, 2007). D'autres polymorphismes génétiques ont été caractérisés chez les patients atteints de SII, notamment des polymorphismes dans les gènes codant pour les récepteurs de la sérotonine de type 2 (5-HTR2A et 5-HTR2C), de type 3 (5-HTR3A et 5-HTR3E) ou de type 4 (5-HTR4). L'implication des récepteurs 5-HTR3 dans le développement de la pathologie a été mise en avant puisque l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs diminue les symptômes des patients atteints de SII-D (Garsed *et al.*, 2014; Spiller, 2011). Cependant, les différentes cohortes étudiées n'ont pas permis de caractériser un polymorphisme typique de la pathologie (Jun *et al.*, 2014, 2011; Mulak *et al.*, 2013).

❖ *Fonction neuronale.*

Dans 60% des cas, les patients SII ont une perception douloureuse augmentée due à une sensibilisation neuronale. Un polymorphisme du gène codant les canaux sodiques NaV1.5 a été rapporté et se traduit par une hyperexcitabilité neuronale suggérant l'implication de ces canaux dans le développement des symptômes du SII (Beyder *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2009). D'autres polymorphismes génétiques touchant la fonction neuronale ont été caractérisés notamment ceux de gènes codant pour les récepteurs alpha adrénergiques (Choi *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2004; Sikander *et al.*, 2010), la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), le récepteur  $\mu$  aux opioïdes (ORPM1), le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CCNRI) ou encore les hydrolases des amides d'acides gras (FAAH) (Camilleri *et al.*, 2008, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Karling *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011). Cependant, les liens directs entre ces polymorphismes et le SII restent encore très controversés.

❖ *Barrière épithéliale.*

L'altération de la barrière épithéliale chez les patients atteints de SII-D a permis de mettre en évidence des profils d'expression différents des gènes codant les protéines de jonctions serrées telles que les occludines, la *zonula occludens* 1 (ZO-1) ou les claudines 1 et 2 (Dunlop *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2012, 2013). De plus, des variants du gène codant CDC42, qui contrôle l'adressage des protéines de jonctions à la membrane, ont été identifiés comme des facteurs de prédisposition au développement d'un SII-C (Wouters *et al.*, 2014). Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour identifier et valider l'importance de ces polymorphismes dans la genèse du SII.

❖ *Système immunitaire.*

La dérégulation du système immunitaire conduisant à une inflammation dite « de bas grade » a été décrite comme un mécanisme à l'origine du développement d'un SII (voir Chapitre 2). De multiples polymorphismes génétiques en lien avec le système immunitaire ont été associés positivement au développement d'un SII (Saito, 2011). Néanmoins, la disparité des résultats ne permet pas encore de conclure sur l'importance d'un polymorphisme en particulier. Une méta-analyse a fait ressortir un polymorphisme du gène codant la cytokine TNFSF15 (*tumor necrosis factor* de la famille 15) associé au développement d'un SII (Czogalla *et al.*, 2015;

Lee et Park, 2014; Swan *et al.*, 2013; Zucchelli *et al.*, 2011). Ce polymorphisme est également décrit comme un facteur de prédisposition dans les MICI. Les MICI se caractérisent par des phases de poussées et de rémission. Les symptômes associés aux phases de rémission sont similaires à ceux que l'on peut retrouver chez les patients atteints de SII. Un diagnostic précis est donc nécessaire pour discriminer les phases de rémissions du SII.

#### ❖ *Épigénétique.*

Peu d'informations concernent l'implication de facteurs épigénétiques dans la genèse du SII. Seules quelques études portant sur le rôle de petits ARN non codants ont permis de montrer une modification des profils de l'expression de certains micro-ARN (miARN) dans la muqueuse intestinale de patients atteints de SII-D. Ainsi une augmentation de l'expression des miARN miR-29a et miR-29b impliqués dans la perméabilité intestinale *via* la régulation des gènes codant la glutamine synthétase, la claudine 1 et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-Kappa B*), a été constatée chez ces patients (Zhou *et al.*, 2010, 2015). À l'inverse, une diminution de l'expression de miR-103, miR-16 et miR-125b a été associée à l'augmentation de l'expression des gènes codant la claudine 2 et la cinguline (Martínez *et al.*, 2017). La diminution de l'expression de miR-199 a été quant à elle corrélée à l'augmentation de l'expression du gène codant le récepteur TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloïde type 1*) et donc à l'hypersensibilité viscérale (Zhou *et al.*, 2016). Il a été également décrit que des mutations dans la région de fixation de miR-510 et miR-16 des gènes HTR3E et HTR4B, empêchent leur fixation et donc la régulation de l'expression de ces gènes par ces micro-ARN (Kapeller *et al.*, 2008; Wohlfarth *et al.*, 2017). Une étude a relevé des taux importants de miR-150 et de miR-342-3p circulants chez les patients atteints de SII (Fourie *et al.*, 2014). À noter que miR-150 a été associé positivement au développement de MICI et à la douleur et miR-342-3p cible des gènes impliqués dans la signalisation de la douleur, la motilité du côlon et la fonctionnalité des muscles lisses (Gheinani *et al.*, 2013).

#### 4.2.2. Facteurs psychologiques

De multiples facteurs psychologiques ont été caractérisés comme des facteurs de risques dans le développement du SII, tels que le stress (Endo *et al.*, 2011; Rajindrajith et Devanarayana, 2012; Song *et al.*, 2012), l'anxiété (Dong *et al.*, 2005; Giannetti *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2012), la

dépression (Dong *et al.*, 2005) ou des éléments stressants dans la petite enfance tels que les abus sexuels (Dong *et al.*, 2005; Ranasinghe *et al.*, 2018). De plus, l'exposition à ces facteurs psychologiques favorise la persistance des symptômes à l'âge adulte (Drossman, 2011).

#### 4.2.3. Alimentation

Environ 70% des patients atteints de SII attribuent leurs symptômes à leur alimentation (Park et Camilleri, 2006; Simrén *et al.*, 2001) et plusieurs études ont permis de préciser le rôle que certains aliments peuvent jouer dans cette pathologie (El-Salhy *et al.*, 2012; Eswaran *et al.*, 2011; Heizer *et al.*, 2009; Lee et Park, 2014). Le risque de développer un SII est en effet augmenté lors de la consommation d'aliments épicés ou frits (Dong *et al.*, 2005). Certains nutriments, tels que les graisses, les carbohydrates et le gluten, peuvent moduler la motilité intestinale, la barrière épithéliale, la sensibilité et la composition du microbiote intestinal (Barbara *et al.*, 2016; Boeckxstaens *et al.*, 2016; Hayes *et al.*, 2014; Vanner *et al.*, 2016). Les mécanismes suivants ont été alors proposés pour expliquer les liens entre le SII et l'alimentation (Gibson, 2011).

Les allergies alimentaires peuvent entraîner une modification du microbiote, une inflammation de bas grade, une augmentation de la perméabilité intestinale ainsi que de l'hypersensibilité viscérale (Barbara *et al.*, 2016; El-Salhy *et al.*, 2012; Lee et Park, 2014; Soares, 2014). Les aliments à base de blé, les œufs ou encore le lait sont composés d'amines ou de salicylates qui peuvent induire une hypersensibilité viscérale, des ballonnements ou de la diarrhée, des symptômes caractéristiques des patients atteints de SII (Niec *et al.*, 1998). Une exposition chronique à ces substances peut donc jouer un rôle dans la survenue ou l'aggravation des symptômes du SII. Certaines études démontrent une association entre les allergies alimentaires et le SII chez l'enfant mais ces résultats n'ont pas été retrouvés chez l'adulte (Ozol *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2014).

La production de gaz peut entraîner la modulation de la motilité intestinale et/ou la distension du colon, impliqués dans la genèse des symptômes du SII (Dickson, 2018; Simrén, 2014; Staudacher *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2018). Une surproduction de gaz peut être induite par la consommation de glucides fermentescibles à chaîne courte appelés FODMAPs qui sont des aliments riches en oligosaccharides, disaccharides et polyols (El-Salhy *et al.*, 2012; Lee et Park, 2014). Ces FODMAPs sont essentiellement retrouvés dans des aliments d'origine végétale (céréales, certains légumes et fruits..) mais aussi dans les produits laitiers (El-Salhy *et al.*, 2012;



Lee et Park, 2014). Ces carbohydrates sont métabolisés en gaz ou en acides gras à chaîne courte (AGCC) par les communautés microbiennes du colon et sont décrits pour être à l'origine de certains troubles gastro-intestinaux.

Le gluten est un facteur bien connu pour altérer l'homéostasie intestinale comme dans la maladie cœliaque (Barbara *et al.*, 2016). Actuellement, il est difficile de différencier cette pathologie du SII (El-Salhy *et al.*, 2012; Lee et Park, 2014). Cependant, l'implication du gluten dans la genèse du SII n'est pas clairement établie (Biesiekierski *et al.*, 2013).

#### 4.2.4. Infections gastro-intestinales

Le développement d'un SII peut subvenir à la suite d'une infection gastro-intestinale aiguë d'origine bactérienne, parasitaire ou virale, on parle alors de SII-post-infectieux (PI). La prévalence du SII-PI varie entre 4 et 36% avec des symptômes qui peuvent persister jusqu'à 10 ans après l'infection gastro-intestinale (Klem *et al.*, 2017). A l'origine du développement du SII-PI on retrouve majoritairement des bactéries telles que *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* ou *Escherichia coli* (O157:H7) ainsi que des parasites (*Giardia duodenalis*, *Trichinella spiralis*, *Blastocystis*) ou des virus tels que les norovirus (Cremon *et al.*, 2014; Hanevik *et al.*, 2014; Kowalczyk *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2014; Porter *et al.*, 2012; Wensaas *et al.*, 2012; Youn *et al.*, 2016; Zanini *et al.*, 2012). Le risque de développer un SII est fortement augmenté suite à une infection parasitaire (+40%) en comparaison aux infections bactériennes (+14%) ou virales (+4%) (Klem *et al.*, 2017). La virulence du pathogène mais également la durée de l'infection sont également des facteurs de risque dans le cadre du SII-PI (Lee *et al.*, 2017b). Des facteurs liés à l'hôte sont également impliqués dans le SII-PI, tels que le sexe, la prédisposition génétique, les altérations psychologiques ou psychiatriques, le tabagisme ou encore les antibiothérapies prolongées (Downs *et al.*, 2017; Klem *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017b). En revanche, l'âge ou la région géographique ne sont pas des facteurs de prédisposition. Les patients présentent un phénotype diarrhéique dans 40% des cas de SII-PI et un phénotype mixte dans 46% des cas. Il est plus rare de retrouver un phénotype à prédominance de constipation suite à une infection gastro-intestinale (15% des patients SII-PI) (Klem *et al.*, 2017).

## 5. Traitements

Les traitements de première intention visent à diminuer la fréquence et l'intensité des symptômes c'est-à-dire à réduire les troubles du transit et/ou les douleurs abdominales. Les nouveaux traitements ciblent, quant à eux, différents processus physiopathologiques tels que le microenvironnement de l'intestin (alimentation et microbiote intestinal), la sécrétion, la motilité, la barrière intestinale ou l'axe cerveau-intestin.

### 5.1. Traitements pharmacologiques

#### 5.1.1. Traitements de la douleur

##### ❖ *Antispasmodiques*

La douleur dans le SII est médiée par des mécanismes périphériques et centraux. Elle découle en partie des spasmes résultant de la contraction des muscles lisses. Deux classes d'antispasmodiques sont utilisées: (i) les anticholinergiques qui empêchent la liaison de l'acétylcholine aux récepteurs muscariniques (Krueger *et al.*, 2013) et (ii) les antispasmodiques musculotropes qui sont des inhibiteurs des canaux calciques agissant directement sur les muscles lisses (Ruepert *et al.*, 2011). Les effets bénéfiques du bromure d'otilinium (musculotrope) et de l'hyoscine (anticholinergique) ont été décrits chez des patients atteints de SII (Clavé et Tack, 2017; Ford *et al.*, 2008). Le tiropramide et l'huile de poivre mentholée qui sont des inhibiteurs des canaux calciques réduisent également les douleurs abdominales de manière similaire au bromure d'otilinium (Cash *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2014a). Néanmoins, des effets délétères sont décrits pour les deux types d'antispasmodiques. Les antispasmodiques anticholinergiques peuvent, en effet, induire de la constipation due au blocage des sécrétions dans la lumière intestinale. Ainsi, ils sont utilisés chez des patients ne présentant pas de constipation. Les antispasmodiques musculotropes peuvent conduire, quant à eux, à des problèmes cardiovasculaires.

❖ *Antidépresseurs*

Les antidépresseurs notamment les antidépresseurs tricycliques ou les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont recommandés dans le traitement de la douleur chez les patients atteints du SII qui sont réfractaires aux antispasmodiques ou qui présentent des formes sévères de la maladie. Cependant, ces molécules sont utilisées hors AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) dans le cadre du traitement du SII. Le mode d'action de faibles doses d'antidépresseurs n'est pas bien connu mais il serait à la fois périphérique, *via* l'altération de la transmission cholinergique et/ou histaminergique dans le tractus gastro-intestinal, et central *via* la modulation des voies descendantes de la douleur (Moret et Briley, 2006). Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont généralement mieux tolérés que les antidépresseurs tricycliques qui ont pour effets indésirables la constipation, la fatigue et la somnolence. Ces molécules semblent donc particulièrement efficaces pour traiter la douleur chez les patients atteints de SII-D mais ne sont pas appropriées pour les patients atteints de SII-C.

5.1.2. Traitements des patients atteints de SII-C (**Figure 5**)❖ *Laxatifs*

Chez les patients atteints de SII-C, les laxatifs tels que le senna ou le docusate semblent efficaces. Par contre, l'utilisation du lactulose n'est pas recommandée puisque ce disaccharide est très mal toléré par les patients. Le linaclotide, un agoniste de la guanylate cyclase, peut être utilisé en seconde intention si le traitement à base de laxatifs n'a pas été efficace. En plus d'augmenter la motilité intestinale, il a également des propriétés analgésiques *via* la modulation des nocicepteurs présents sur les fibres afférentes primaires (FAP) coliques (Castro *et al.*, 2013). Ces effets tendent à réduire la douleur abdominale et les troubles du transit (Chey *et al.*, 2012; Lembo *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2012). Néanmoins, chez 5% des patients atteints de SII-C le linaclotide peut provoquer des diarrhées sévères (Chey *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2012).

Le lubiprostone est un acide gras bi-cyclique dérivé de la prostaglandine E1 qui active les canaux chlores de type 2 présents sur les entérocytes augmentant ainsi la sécrétion d'eau et d'électrolytes. De ce fait, il a montré une efficacité dans le traitement des symptômes chez les patients atteints de SII-C (Barish *et al.*, 2010; Drossman *et al.*, 2009). Cependant, comme le linaclotide, il peut induire de sévères diarrhées chez les patients (Chey *et al.*, 2012).

Les agonistes des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> de la sérotonine stimulent le transit intestinale et les sécrétions *via* la production d'acétylcholine par les neurones excitateurs et les interneurons (Gershon et Tack, 2007). C'est le cas du tégaserode dont l'efficacité a été montrée chez les patients atteints de SII-C dans un certain nombre d'études (Ford *et al.*, 2009). Néanmoins, des effets indésirables notamment de la diarrhée mais aussi des troubles cardiovasculaires en ont limité son utilisation. Le prucalopride semble être un agoniste plus sélectif des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> (Tack et Corsetti, 2012; Tack *et al.*, 2012). Utilisé pour traiter des cas de constipation chronique, aucun essai clinique n'a été encore réalisé chez les patients atteints de SII-C (Tack *et al.*, 2012).

#### ❖ *Autre molécules*

Le Tenapanor est un inhibiteur de l'échangeur sodium/hydrogène NHE3, présent sur la membrane apicale des entérocytes. Il permet de diminuer l'absorption de sodium et de phosphate de manière dose-dépendante ce qui a pour conséquence d'augmenter le transit intestinal et de favoriser le soulagement de la constipation (Chey *et al.*, 2017). Après des résultats convaincants en phase II, une étude de phase III sur 12 semaines a montré la diminution de la douleur et une augmentation du transit chez les patients souffrant de SII-C. Une étude de phase III de 26 semaines est actuellement en cours (<http://ir.ardelyx.com/news-releases/news-release-details/ardelyxs-pivotal-phase-3-study-tenapanor-ibs-c-hits-primary-and>).

### 5.1.3. Traitements des patients atteints de SII-D (**Figure 6**)

#### ❖ *Anti-diarrhéiques*

Le loperamide est un anti-diarrhéique, agoniste des récepteur  $\mu$  aux opioïdes, utilisé pour le traitement des symptômes chez les patients atteints de SII-D. Le loperamide ne passant pas la barrière hématoencéphalique, les effets délétères sont limités. Il permet de réduire la fréquence des selles et d'augmenter leur consistance (Efskind *et al.*, 1996).

L'éluxadoline est un mixte d'agonistes des récepteurs  $\mu$  et d'antagonistes des récepteurs  $\delta$  aux opioïdes développé pour le traitement des patients atteints de SII-D (Lacy, 2016). Deux essais en phase III ont montré une diminution des douleurs abdominales et des diarrhées

(Lembo *et al.*, 2016b). Cependant, le risque de développer une pancréatite a été rapporté.

Les antagonistes de récepteurs 5-HT<sub>3</sub> de la sérotonine tels que l'alosétron, le ramosétron ou l'ondansétron montrent une efficacité dans le traitement des symptômes des patients atteints de SII-D. Leur mécanisme d'action est complexe et peu connu mais ils seraient impliqués dans l'inhibition de la composante excitatrice ascendante du réflexe péristaltique et des contractions propagatrices de grande amplitude dans le tractus gastro-intestinal (Clavé, 2011). De plus, un effet central sur la douleur ne peut être exclu (Berman *et al.*, 2002). Malgré l'efficacité de l'alosétron chez les patients (Ford *et al.*, 2009), les risques d'ischémies lors du traitement ont limité son utilisation (Chang *et al.*, 2006). Quant aux deux autres antagonistes, le ramosétron et l'ondansétron, ils ont donné de bons résultats phase clinique (Fukudo *et al.*, 2014, 2016; Garsed *et al.*, 2014).

#### ❖ *Autres molécules*

Les tachykinines, appartenant à la famille des neuropeptides, tels que la substance P ou la neurokinine A sont des médiateurs importants dans la motilité et la nociception (Holzer et Holzer-Petsche, 1997). L'ibodutant est un inhibiteur de ces médiateurs qui a été développé pour le traitement des patients atteints de SII-D (Corsetti *et al.*, 2015). Des effets bénéfiques ont été observés lors d'essais en phase II chez les femmes atteintes de SII mais les études en phase III n'ont pas confirmé son efficacité.

La sérotonine est synthétisée par la tryptophane hydroxylase-1. Le LX1031, un inhibiteur de cette enzyme, réduit la douleur et permet une amélioration de la consistance des selles chez les patients atteints de SII-D (Brown *et al.*, 2011). Néanmoins, son implication dans le développement d'un syndrome carcinoïde a ralenti son développement (Kulke *et al.*, 2017).

L'asimadoline est un agoniste spécifique des récepteurs  $\kappa$  aux opioïdes avec une faible pénétration de la barrière hématoencéphalique (Mangel et Hicks, 2012). L'effet bénéfique n'a été démontré en phase II que chez les patients atteints de SII-D mais aucun résultat de l'étude de phase III réalisée en 2013 n'a été publié.

## 5.2. Traitements non pharmacologiques

### 5.2.1. Nutritionnels

La majorité des patients atteints de SII présentent une aggravation de leurs symptômes après l'ingestion de certains aliments et particulièrement après un repas riche en carbohydrates et lipides, et fortement calorique (Böhn *et al.*, 2013; Le Nevé *et al.*, 2013; Posserud *et al.*, 2013). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables des symptômes liés à l'alimentation. L'alimentation peut ainsi agir de façon directe sur l'osmolarité, les composés chimiques ou encore le péristaltisme, mais elle peut aussi agir de façon indirecte *via* le microbiote intestinal. Ces effets peuvent conduire au développement des symptômes comme l'hypersensibilité viscérale, la dérégulation de l'axe cerveau/intestin ou l'altération de la motilité et/ou la perméabilité intestinale (Spencer *et al.*, 2014). Les premières recommandations sont de manger « plus sainement », c'est-à-dire éviter ou limiter la consommation d'alcool, de caféine, d'aliments épicés ou riches en graisses, mais aussi de limiter la taille et le nombre de repas.

Lorsque les symptômes ne sont pas réduits avec cette alimentation plus « saine », il est alors proposé de suivre un régime pauvre en FODMAPs. De nombreuses études cliniques ont, en effet, rapporté une réduction importante des symptômes chez des patients atteints du SII avec une alimentation appauvrie en FODMAPs (Halmos *et al.*, 2014; Pourmand et Esmailzadeh, 2017; Shepherd *et al.*, 2008; Staudacher *et al.*, 2017; Zahedi *et al.*, 2018). Jusqu'à présent, la plupart des études ont été réalisées sur de courtes périodes (jusqu'à 4 semaines) mais un régime appauvri en FODMAPs plutôt qu'une élimination complète des habitudes alimentaires pourrait être efficace sur du plus long terme (O'Keefe *et al.*, 2018; Whelan *et al.*, 2018). Par ailleurs, un régime appauvri en FODMAPS peut favoriser les modifications de la composition du microbiote intestinal (Schumann *et al.*, 2018). Ainsi, ce régime peut donc être utilisé en combinaison avec des probiotiques afin de préserver le microbiote intestinal et prévenir notamment la réduction de l'abondance du genre *Bifidobacterium* caractéristique des patients atteints de SII (Staudacher *et al.*, 2017).

Un régime sans gluten a été également évoqué dans le traitement des symptômes du SII (Biesiekierski *et al.*, 2011). Des évidences émergent quant à la diminution de l'activation du système immunitaire dans le cadre d'un régime sans gluten (Uhde *et al.*, 2016). Cependant, aucun lien direct n'a été établi entre le développement des symptômes associés au SII et le gluten.

### 5.2.2. Modulation de la composition du microbiote intestinal

La mise en évidence du rôle central du microbiote intestinal dans le SII a incité à utiliser des antibiotiques, des probiotiques ou des pré-biotiques dans le traitement des symptômes. Le rôle du microbiote dans la physiopathologie du SII sera abordé dans le Chapitre 2.

#### ❖ *Traitements à base d'antibiotiques*

Les patients atteints de SII présentent des modifications de la composition et de la fonction du microbiote (voir Chapitre 2). En se basant sur ces constatations, l'utilisation d'antibiotiques non absorbables a été suggérée pour traiter les patients. Initialement, la néomycine a révélé des effets bénéfiques (diminution de gaz) (Pimentel *et al.*, 2003) mais le développement de résistances bactériennes en a limité son utilisation (Distrutti *et al.*, 2016; Pimentel *et al.*, 2000; Rezaie *et al.*, 2010). La rifaximine est un antibiotique à large spectre (bactéries aérobies et anaérobies à Gram positif et négatif) présentant un plus faible risque de sélectionner des bactéries résistantes (Koo et DuPont, 2010). Après un premier essai clinique de faible ampleur (Pimentel *et al.*, 2006a; Sharara *et al.*, 2006), une étude clinique à grande échelle a été réalisée chez des patients atteints de SII-D. Les résultats montrent ainsi que 8 à 10% des patients ont un soulagement des symptômes dans les 10 semaines qui suivent un traitement de 2 semaines à la rifaximine (Pimentel *et al.*, 2011; Schoenfeld *et al.*, 2014). Cependant, ces effets bénéfiques disparaissant après 10 semaines, un second traitement a été ajouté au premier dans certaines études randomisées. Suite à ce deuxième traitement, les patients atteints de SII-D ont également montré une nette amélioration de leur qualité de vie et aucune résistance bactérienne n'a été décrite (Lembo *et al.*, 2016a; Pimentel *et al.*, 2017). L'utilisation de cet antibiotique dans le cadre du SII a été approuvée aux Etats-Unis mais elle reste controversée en Europe. En effet, il faut noter que l'utilisation d'antibiotiques est un facteur de risque dans le développement du SII (Krogsgaard *et al.*, 2018; Paula *et al.*, 2015). Le microbiote intestinal jouant un rôle dans la genèse des symptômes (voir Chapitre 2), la modulation de sa composition par les antibiotiques peut conduire au développement d'une dysbiose intestinale impliquée dans la genèse de la pathologie.

❖ *Utilisation de probiotiques*

La définition des probiotiques a été formulée pour la première fois en 2002 et confirmée en 2013 par l'association scientifique internationale pour les probiotiques et les pré-biotiques (Hill *et al.*, 2014). Les probiotiques sont « des souches vivantes de micro-organismes sélectionnées et qui lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante confèrent un avantage pour la santé de l'hôte ».

En accord avec la modulation du microbiote chez les patients atteints de SII, les probiotiques utilisés sont composés principalement de bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* connues pour leurs effets bénéfiques chez l'hôte (voir Chapitre 2).

Dans les traitements à base d'une combinaison de plusieurs souches de probiotiques, on s'aperçoit qu'il y a une forte hétérogénéité dans la composition des souches utilisées, leur quantité et dans la durée des traitements. Sur 27 études répertoriées par Enck et Mazurak, 14 n'ont montré aucun effet bénéfique chez les patients, des effets secondaires ont même été rapportés chez certains suite au traitement (Enck et Mazurak, 2018a). Ainsi, 13 études sur 27 ont décrit des effets positifs sur les symptômes du SII.

De manière surprenante, les traitements n'utilisant qu'une souche de probiotiques semblent avoir une efficacité plus importante. Enck et Mazurak ont répertorié 29 articles publiés entre 1989 et 2014 (Enck et Mazurak, 2018a). Comme pour les probiotiques multi-souches il existe une grande hétérogénéité concernant les souches utilisées, les quantités administrées (entre  $10^8$  et  $10^{11}$ ), le nombre de patients inclus dans ces études et la durée du traitement (entre 4 et 12 semaines). L'efficacité des traitements probiotiques semble varier principalement en fonction de la souche utilisée. Les souches les plus fréquemment utilisées sont des espèce du genre *Lactobacillus*: *L. plantarum* (Ducrotté *et al.*, 2012; Ligaarden *et al.*, 2010; Niedzielin *et al.*, 2001; Nobaek *et al.*, 2000; Sen *et al.*, 2002; Stevenson *et al.*, 2014), *L. brevis* (Murakami *et al.*, 2012), *L. acidophilus* (Halpern *et al.*, 1996; Sinn *et al.*, 2008), *L. reuteri* (Niv *et al.*, 2005), *L. rhamnosus* (O'Sullivan et O'Morain, 2000) et *L. casei* (Dapoigny *et al.*, 2012). On retrouve également de nombreuses souches du genre *Bifidobacterium*: *B. bifidum* (Guglielmetti *et al.*, 2011), *B. lactis* (Agrawal *et al.*, 2009), *B. animalis* (Guyonnet *et al.*, 2007) et *B. infantis* (Charbonneau *et al.*, 2013; Whorwell *et al.*, 2006). D'autres études ont également évalué l'impact de levures comme *Saccharomyces boulardii* (Abbas *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2011; Kabir *et al.*, 2011) ou *S. cerevisiae* (Pineton de Chambrun *et al.*, 2015). Enfin, plus récemment, des souches de *Streptococcus faecium* (Gade et Thorn, 1989), de *Bacillus coagulans* et d'*Escherichia coli* (Nissle) ont été



utilisées (Kruis *et al.*, 2012). Sur les 29 études actuellement répertoriées 13 ont montré des effets bénéfiques sur les symptômes (Enck et Mazurak, 2018a). De manière générale, l'utilisation de bifidobactéries semble être plus efficace que l'utilisation de lactobacilles.

Ces divergences au sein des résultats font qu'actuellement les probiotiques ne sont pas ou peu utilisés dans le traitement du SII. Des investigations complémentaires sont donc nécessaires.

#### ❖ *Utilisation de pré-biotiques*

Les pré-biotiques définis depuis 2007 comme « un composant alimentaire inerte qui confère un avantage pour la santé de l'hôte en association avec la modulation du microbiote » (Pineiro *et al.*, 2008).

Les pré-biotiques peuvent être des disaccharides ou des polysaccharides provenant de sources naturelles telles que les céréales ou les fruits ou d'origine synthétique comme le lactulose (Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018). Les pré-biotiques sont résistants aux digestions enzymatiques et chimiques ce qui leur permet d'atteindre le côlon et d'être métabolisés en AGCC par les communautés bactériennes commensales. Ces AGCC comprenant l'acétate, le propionate et le butyrate sont impliqués dans l'homéostasie intestinale (voir Chapitre 2). Les pré-biotiques ont également la capacité de moduler la composition du microbiote intestinal et de favoriser le développement certaines espèces bénéfiques pour l'hôte telles que les bifidobactéries ou les lactobacilles (Roberfroid *et al.*, 2010; Wilson et Whelan, 2017).

Des essais cliniques randomisés à base de pré-biotiques ont été réalisés chez les patients atteints de SII mais les résultats obtenus sont assez hétérogènes. Néanmoins, certaines études indiquent une amélioration des symptômes associée à une augmentation de l'abondance relative des bifidobactéries et de la production d'AGCC (Gibson et Wang, 1994b, 1994a; Mego *et al.*, 2017; Paineau *et al.*, 2008; Vogt *et al.*, 2015; Vulevic *et al.*, 2015). L'abondance relative des bifidobactéries étant généralement diminuée chez les patients atteints de SII (voir Chapitre 2), il semble intéressant de favoriser cette population bactérienne afin de réduire les symptômes. Cependant, malgré certaines évidences, peu d'essais ont été réalisés avec les pré-biotiques et ne permettent pas de conclure sur leur efficacité. Les pré-biotiques sont donc à l'heure actuelle peu utilisés pour traiter les patients atteints de SII (Ford *et al.*, 2014b, 2014a). Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer leur efficacité dans le traitement du SII.

### ❖ *Utilisation de symbiotiques*

Les symbiotiques sont une combinaison de pré-biotiques et de probiotiques pouvant avoir un effet synergique, c'est-à-dire un effet cumulatif. Cependant, peu d'études randomisées ont été réalisées (Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018). De manière globale les probiotiques utilisés, en association avec des pré-biotiques, sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les études rapportent une réduction des douleurs abdominales, ballonnements et une amélioration du transit chez les enfants et les adultes atteints de SII (Baştürk *et al.*, 2016; Bogovič Matijašić *et al.*, 2016; Min *et al.*, 2012; Rogha *et al.*, 2014; Saneian *et al.*, 2015; Tsuchiya *et al.*, 2004). L'utilisation de *Saccharomyces boulardii* en association avec des téguments de psyllium blond (plantain des Indes ou Ispaghul) a permis de réduire les concentrations sériques de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et TNF- $\alpha$ ) et d'augmenter la concentration sérique de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (Abbas *et al.*, 2014). Malgré des évidences prometteuses, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour démontrer l'efficacité des symbiotiques dans la gestion du SII.

### ❖ *Transplantation de microbiote fécal*

Des altérations du microbiote intestinal ont été constatées dans différentes pathologies, suscitant l'intérêt de la transplantation de microbiote fécal (TMF) pour la mise en place de traitements alternatifs (Halkjær *et al.*, 2017; Pinn *et al.*, 2015). La TMF a ainsi montré son efficacité dans le traitement des infections par *Clostridium difficile* (Cammarota *et al.*, 2017). A ce jour, seules deux études cliniques randomisées chez des patients atteints de SII ont été publiées mais avec des résultats contradictoires (Halkjær *et al.*, 2018; Johnsen *et al.*, 2018). Johnsen *et al.*, ont montré que la TMF favorise la résolution des symptômes (Johnsen *et al.*, 2018). A contrario, Halkjaer *et al.*, ne montrent pas d'effet de la TMF sur l'amélioration des symptômes, malgré que ces patients présentent une diversité microbienne augmentée par rapport aux patients ayant reçu le placebo (Halkjær *et al.*, 2018). Des investigations complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la TMF.

### 5.2.3. Méthodes alternatives

Les patients insatisfaits des traitements « classiques » se retournent fréquemment vers un ou plusieurs traitements alternatifs. Les troubles psychologiques contribuant à la physiopathologie du SII (voir Chapitre 2), les thérapies cognitivo-comportementales, la gestion du stress, les thérapies psychosociales ou encore l'hypnose peuvent être des options en cas d'échecs thérapeutiques. De plus, leur utilisation dans certains cas en complément de traitements pharmacologiques permet de réduire la consommation de médicaments (Ahl *et al.*, 2013; Levy *et al.*, 2006; Pajak *et al.*, 2013). D'autres méthodes alternatives sont encore à l'étude comme l'ostéopathie ou l'acupuncture (Attali *et al.*, 2013; Chao et Zhang, 2014; Florance *et al.*, 2012; Pei *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). L'activité physique permet également de réduire les symptômes (Johannesson *et al.*, 2011, 2015).

Par ailleurs, il a été démontré que les patients ont souvent des préjugés notamment sur les risques d'évolution de la maladie ce qui contribue à augmenter leur anxiété et aggrave souvent les symptômes. Le fait d'informer les patients sur les causes de la maladie diminue le recours aux soins et la sévérité du SII, on parle alors « d'éducation thérapeutique » (Halpert, 2018; Jóc *et al.*, 2015).

## Synthèse

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est une pathologie complexe qui se caractérise par des douleurs abdominales et des troubles du transit. Le diagnostic repose essentiellement sur les symptômes (critères de Rome IV). L'étiologie de cette pathologie est complexe puisque des facteurs propres à l'hôte (sexe, âge, génétique) et des facteurs environnementaux (facteurs psychologiques, alimentation, infection) interviennent dans la genèse des symptômes. Les mécanismes physiopathologiques sont donc nombreux et complexes entraînant un manque flagrant de thérapies efficaces malgré la diversité des traitements utilisés. Une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait permettre l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes et une médecine personnalisée et ciblée.

---

## Chapitre 2: Altération de l'axe cerveau/intestin/microbiote dans le SII

---

Le syndrome de l'intestin irritable est une pathologie multifactorielle dont la physiopathologie reste complexe et peu connue. De nombreuses altérations gastro-intestinales ainsi que des perturbations centrales ont été décrites chez les patients atteints du SII. Les anomalies gastro-intestinales sont nombreuses avec notamment une activation du système immunitaire, une perturbation de la barrière intestinale et une modification (dysbiose) de la composition et de la fonction du microbiote intestinal (Enck *et al.*, 2016). Depuis quelques années, plusieurs études montrent que ces perturbations sont associées à une dérégulation de l'axe cerveau/intestin et que le microbiote intestinal joue un rôle fondamental. C'est pour ces raisons que l'on parle d'axe cerveau/intestin/microbiote.

### 1. Perturbations centrales

#### 1.1. Cognition

Les premiers travaux dédiés à l'étude de la fonction cognitive chez les patients atteints de SII ont montré que ces derniers présentent une perception douloureuse exacerbée suite à un stimulus viscéral (Elsenbruch *et al.*, 2010; Hauser *et al.*, 2014; Lackner et Gurtman, 2004). L'appréhension de ces symptômes douloureux modifie la composante cognitivo-comportementale de ces individus contribuant à l'aggravation des symptômes associés au SII (Hauser *et al.*, 2014; Kennedy *et al.*, 2012). Trois troubles cognitivo-comportementaux sont souvent associés au SII : une hypervigilance avec une attention sélective envers les symptômes gastro-intestinaux, une somatisation et une « catastrophisation » de la douleur qui se traduisent par une focalisation et une exacerbation de la perception douloureuse conduisant à une évaluation négative de sa gestion de la douleur (Hauser *et al.*, 2014; Kennedy *et al.*, 2012; Lackner et Gurtman, 2004). Ces troubles cognitifs peuvent découler ou avoir des répercussions sur l'humeur, le sommeil mais également sur le stress, la douleur, le microbiote intestinal et

l'activation du système immunitaire. En effet, une relation a été établie entre le taux de cortisol et la mémoire épisodique médiée par l'hippocampe. De plus, le passage de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) au niveau du système nerveux central conduit au développement de troubles cognitifs (Kennedy *et al.*, 2014a).

La communication entre la cognition et la douleur est bidirectionnelle, la composante cognitive influençant la perception douloureuse et inversement. En 2012, Kennedy *et al.*, ont suggéré que le SII était un syndrome associé à une déficience cognitive (Kennedy *et al.*, 2012). Cette hypothèse a été ensuite appuyée par d'autres études qui ont caractérisé, par des approches neuropsychologiques, les altérations cognitives chez les patients atteints de SII. L'apprentissage, la flexibilité attentionnelle, l'attention sélective, l'inhibition de la réponse ainsi que différents domaines de la mémoire ont alors été étudiés. Un déficit de la mémoire spatio-visuelle médié par l'axe HHS a été décrit chez les patients atteints de SII (Kennedy *et al.*, 2014a). Le développement des techniques d'imagerie cérébrale a également permis de mettre en évidence la difficulté des patients atteints de SII à réaliser un test de flexibilité cognitive associée à une activation anormale des régions cérébrales préfrontales durant le test (Aizawa *et al.*, 2012). Cependant, il existe une forte disparité entre les études réalisées qui traduit la complexité du SII et appuie la nécessité de prendre en compte les différentes variables associées à cette colopathie fonctionnelle (Kennedy *et al.*, 2014b).

## 1.2. Comorbidités psychiatriques

Il est actuellement bien établi que les comorbidités psychiatriques telles que l'anxiété et la dépression sont retrouvées chez de nombreux patients atteints du SII (Fond *et al.*, 2014; Kennedy *et al.*, 2014b). Environ 40 à 60% des patients atteints de SII présentent en effet des troubles psychologiques (Levy *et al.*, 2006), 33% souffrent de dépression et 19% sont victimes d'anxiété (Shah *et al.*, 2014). Même s'il est communément admis que les patients atteints de SII souffrent d'anxiété et de dépression de manière plus importante que la population dite contrôle, il existe néanmoins des différences dans la prévalence et la sévérité de ces comorbidités en fonction du sous-type de SII et du sexe des patients (Fond *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017a; Roohafza *et al.*, 2016). En effet, les comorbidités sont généralement plus marquées chez les femmes ainsi que chez les patients atteints de SII-M (Roohafza *et al.*, 2016). La méta-analyse réalisée par Fond *et al.*, montre que les patients atteints de SII de type D et de type C souffrent d'anxiété de manière plus importante, mais seuls les patients atteints de SII-D sont victimes

de dépression (Fond *et al.*, 2014). Une seconde méta-analyse, réalisée en 2017, montre quant à elle que les patients ayant un SII sont touchés par ces comorbidités quel que soit le sous-type de SII (Lee *et al.*, 2017a). Des comorbidités psychiatriques sont donc décrites chez les patients atteints de SII malgré de fortes disparités dans les résultats des études réalisées.

L'axe cerveau/intestin/microbiote joue un rôle important dans l'apparition de ces symptômes bien que les interactions au sein de cet axe ne permettent pas actuellement de définir s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence du SII.

### 1.3. Stress

Le stress chronique est l'un des facteurs de prédisposition majeur dans le développement du SII. En effet, le stress contribue fortement au développement des perturbations intestinales retrouvées chez les patients atteints de SII telles qu'une modification de la motilité intestinale, une hypersensibilité viscérale, une altération de la barrière intestinale ou une dysbiose intestinale (Kennedy *et al.*, 2014b; Oświecimiska *et al.*, 2017; Pellissier et Bonaz, 2017).

La réponse au stress est médiée en partie par l'axe HHS. L'activation de cet axe entraîne la production de corticolibérine (CRF) par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, stimulant ainsi la libération d'adrénocorticotrophine (ACTH) par l'hypophyse antérieure. L'ACTH stimule à son tour le cortex surrénalien afin de libérer du cortisol qui peut alors réguler, *via* un rétrocontrôle négatif, la réponse de l'axe HHS (Juruena, 2014).

Une altération de l'axe HHS ainsi que des perturbations du système nerveux autonome ont été caractérisées chez les patients atteints de SII (Dinan *et al.*, 2006; Elsenbruch et Orr, 2001; Elsenbruch *et al.*, 2004; Fukudo *et al.*, 1998). La concentration de neurohormones (catécholamines) ainsi que le tonus sympathique sont augmentés (Dickhaus *et al.*, 2003; Elsenbruch et Orr, 2001; Elsenbruch *et al.*, 2004; Heitkemper *et al.*, 1996, 2001). Cependant, les données bibliographiques sont contradictoires. De façon générale, il est rapporté une augmentation de la concentration basale de cortisol chez les patients atteints de SII (Heitkemper *et al.*, 1996; Videlock *et al.*, 2016). Toutefois, d'autres études rapportent une diminution des concentrations basales de cortisol chez les patients, allant dans le sens d'une hypoactivité de l'axe HHS (Böhmelt *et al.*, 2005; Norlin *et al.*, 2017).

La dérégulation de l'axe HHS a également été mise en évidence en réponse à des éléments stressants tels qu'une ponction lombaire ou en réponse au test de distension colorectale mais

également en réponse à des éléments stressants ou traumatiques durant la période périnatale ou la petite enfance (FitzGerald *et al.*, 2009; Kano *et al.*, 2017; Videlock *et al.*, 2009). En effet, ce traumatisme dans l'enfance entraîne des perturbations de l'axe HHS caractérisées par une augmentation des taux de cortisol chez les patients qui à l'âge adulte souffrent de SII (Bradford *et al.*, 2012; McGowan *et al.*, 2009; Videlock *et al.*, 2009).

De façon similaire, il existe une forte disparité quant à la dérégulation de l'axe HHS et la sévérité des symptômes. Certaines études ne décrivent pas de corrélation entre les concentrations de cortisol et les symptômes associés au SII (Chang *et al.*, 2009). D'autres études associent de faibles concentrations aux douleurs abdominales et de fortes concentrations aux comorbidités rencontrées (Ehlert *et al.*, 2005; Karling *et al.*, 2016; Kennedy *et al.*, 2014a). À l'inverse, de fortes concentrations en cortisol ont été associées aux douleurs abdominales (Videlock *et al.*, 2016). Finalement, les résultats divergent aussi en fonction du sexe, le SII touchant préférentiellement les femmes qui présentent des perturbations de l'axe HHS différentes de celles retrouvées chez l'homme (FitzGerald *et al.*, 2009; Kano *et al.*, 2017; Videlock *et al.*, 2016).

Malgré l'hétérogénéité des résultats, l'implication de l'axe HHS dans le développement de ce syndrome semble être établie.

## 2. Perturbations de l'homéostasie intestinale

### 2.1. Altérations de la perméabilité intestinale

Des altérations de la perméabilité intestinale ont été caractérisées dans tous les sous-types de SII par des études *in vivo* (dosage de sondes administrées par voie orale) (Camilleri *et al.*, 2012a; Shulman *et al.*, 2014; Del Valle-Pinero *et al.*, 2013) ou *ex vivo* (sur des biopsies *via* des chambres d'Ussing) (Lee *et al.*, 2010; Piche *et al.*, 2009). La modification des composants de la barrière intestinale est également bien documentée mais aucun biomarqueur n'a été validé dans le diagnostic du SII.

L'augmentation de la perméabilité intestinale est considérée comme un événement précoce dans le SII conduisant à l'installation d'une inflammation de bas grade (infiltration de cellules



immunitaires) (Bischoff *et al.*, 2014). En effet, l'augmentation de la perméabilité intestinale a été tout d'abord caractérisée dans le cadre du SII-PI et chez les patients atteints de SII-D (Dunlop *et al.*, 2006). Par la suite, d'autres études *in vivo* utilisant comme marqueur du sucrose, du sucralose, du mannitol ou du lactulose ont montré des taux élevés de ces molécules dans les urines traduisant une augmentation de la perméabilité intestinale chez des individus présentant d'autres sous-types de SII (Shulman *et al.*, 2014; Del Valle-Pinero *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2009). Le remodelage de la barrière épithéliale, se traduisant par de larges espaces entre les cellules et une condensation du cytosquelette, a été décrit par microscopie électronique à partir de biopsies de patients atteints de SII-D (Martínez *et al.*, 2013). De plus, l'utilisation des chambres d'Ussing (dispositif de mesure permettant de mesurer le transport des ions, des nutriments et des molécules d'intérêts à travers différents tissus) a permis de mettre en évidence, sur des biopsies de patients ayant un SII, le passage excessif de molécules fluorescentes confirmant le remodelage de la barrière épithéliale (Lee *et al.*, 2010; Piche *et al.*, 2009). Les résultats obtenus à la fois *in vivo* et *ex vivo* ont démontré que cette augmentation de la perméabilité intestinale était retrouvée aux différents étages du tractus gastro-intestinal (intestin grêle et colon).

Ce remodelage de la barrière épithéliale s'accompagne d'une modulation de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées. En effet, il est décrit une réduction de l'expression et/ou une délocalisation des occludines et de ZO-1 (Bertiaux-Vandaële *et al.*, 2011; Bischoff *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2013; Piche *et al.*, 2009). Ces modifications d'expression des protéines des jonctions serrées s'expliquent à la fois par l'impact du microbiote intestinal mais également par certains médiateurs inflammatoires (eicosanoïdes, histamine, protéases) retrouvés lors d'une inflammation à bas grade. En effet, dans ce contexte inflammatoire, le protéasome peut conduire à la dégradation des jonctions serrées (Coëffier *et al.*, 2010). De plus, la réorganisation des jonctions serrées peut être médiée par les protéases à sérine produites par les mastocytes *via* l'activation des récepteurs PAR-2 (*Protease-activated receptors*) présents à la surface des entérocytes (Lee *et al.*, 2010; O'Sullivan *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2006). De plus, ces effets peuvent être potentialisés par le système nerveux entérique (SNE) (Buhner *et al.*, 2009; Piche *et al.*, 2009).

La sévérité des symptômes du SII comme la douleur abdominale et la survenue de diarrhées ont été corrélées à l'augmentation de la perméabilité intestinale (Camilleri *et al.*, 2012b; Martínez *et al.*, 2013; Wilcz-Villega *et al.*, 2014) suggérant que ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse du SII. Cependant, l'étiologie à l'origine de ces perturbations est peu

documentée. Des facteurs génétiques et épigénétiques, le stress (production de cortisol), la dysbiose intestinale ou encore les allergies alimentaires peuvent être à l'origine des perturbations de la perméabilité intestinale (Bischoff *et al.*, 2014).

## 2.2. Activation du système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Depuis quelques années, il est admis que l'activation du système immunitaire est un facteur clé dans le développement du SII. En effet, il pourrait entraîner un état inflammatoire de bas grade et ainsi expliquer la sensibilisation des FAP et donc de l'HSVC retrouvée chez les patients (Katiraei et Bultron, 2011).

Des mécanismes d'immunité innée et adaptative sont mis en jeu chez les individus souffrant de SII. Des études rapportent une infiltration de cellules immunitaires telles que les éosinophiles, les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et B mais également une augmentation du nombre de cellules résidentes les cellules entérochromaffines, les macrophages et les mastocytes (Hughes *et al.*, 2013). Une méta-analyse a notamment révélé que le SII se caractérise par une augmentation de la quantité de mastocytes et une infiltration de lymphocytes T CD4+ (Bashashati *et al.*, 2018).

Les mastocytes interviennent communément dans la réponse allergique et dans la réponse antiparasitaire médiée par les lymphocytes T helper de type 2 (Th2). L'augmentation du nombre de ces cellules est largement décrite indépendamment du sexe ou du sous-type de SII. Cependant, des différences existent en fonction de l'étage du tractus gastro-intestinal étudié (Bashashati *et al.*, 2018). Leur présence a été corrélée aux symptômes gastro-intestinaux mais également aux comorbidités associées telles que la fatigue et la dépression (Barbara *et al.*, 2004, 2007; Piche *et al.*, 2008). L'activation des mastocytes se traduit par la production de nombreux médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, la tryptase et la sérotonine (5-HT). Ces médiateurs, retrouvés en plus grande quantité dans les selles et les surnageants de biopsies de patients atteints de SII, augmentent l'excitabilité des FAP coliques (Cenac *et al.*, 2007; Róka *et al.*, 2007). En effet, les tryptases, qui appartiennent à la famille des protéases à sérine, sont capables d'activer les FAP *via* le clivage des récepteurs PAR-2 (Barbara *et al.*, 2004; Cenac *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de la libération de sérotonine, associée à l'augmentation du nombre de mastocytes, est corrélée à la sévérité des douleurs abdominales (Cremon *et al.*, 2011). Ces médiateurs inflammatoires sont également impliqués dans la

déstabilisation de la barrière épithéliale intestinale conduisant à la genèse des symptômes (Coëffier *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013).

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la réponse adaptative. Dans le cadre du SII, il est décrit une infiltration de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Bashashati *et al.*, 2018; Chadwick *et al.*, 2002; Cremon *et al.*, 2009, 2011; Lee *et al.*, 2008). Comme pour les mastocytes, aucune différence n'est rapportée selon le sexe ou les sous-types de SII rencontrés (Bashashati *et al.*, 2018). Cependant, l'infiltration lymphocytaire est fortement corrélée au développement d'un SII-PI (Bashashati *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2008). La réponse des lymphocytes T auxiliaires ou (T helper- Th) est connue pour être polarisée en fonction des pathogènes rencontrés, les Th1 permettent de lutter principalement contre des micro-organismes intracellulaires, les Th2 ayant plutôt pour cibles des parasites et notamment les helminthes et les Th17 en réponse à des micro-organismes extracellulaires (Li *et al.*, 2014). Actuellement, aucune donnée n'a été publiée quant à la polarisation des lymphocytes T dans le cas du SII. De plus, une infiltration de la muqueuse par les lymphocytes T est caractéristique d'une inflammation sévère telle que l'on peut rencontrer chez les patients atteints de MICI. Les études décrivant une association de l'infiltration lymphocytaire au SII-PI suggèrent qu'une réponse T mémoire est mise en place à la suite d'une infection. Ainsi une réponse T mémoire expliquerait l'infiltration lymphocytaire et l'absence d'une réponse inflammatoire sévère.

L'inflammation de bas grade se caractérise également par l'augmentation de facteurs pro-inflammatoires au niveau plasmatique et colique. Les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) sont augmentés alors que les taux d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, sont diminués chez les patients atteints de SII (Bashashati *et al.*, 2017; Lazaridis et Germanidis, 2018; Martin-Viñas et Quigley, 2016). Cependant, il existe une disparité des résultats obtenus en fonction du sous-type de SII. Les patients atteints de SII-D ou de SII-PI présentent ainsi des taux plasmatiques d'IL-6 plus importants que des patients atteints de SII-M ou de SII-C (Bashashati *et al.*, 2017; Spiller et Lam, 2012). D'autres études rapportent des taux élevés d'IL-6 et d'IL-8 et une diminution des concentrations d'IL-10 dans les biopsies de patients atteints de SII (Buhner *et al.*, 2009; Martin-Viñas et Quigley, 2016). A l'heure actuelle, il est bien décrit que l'IL-6, l'IL-1- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  ont des répercussions sur l'activité neuronale conduisant à des modifications de la contractilité, de l'absorption et/ou des sécrétions digestives. Les surnageants de biopsies de patients atteints de SII sont, en effet,

capables d'activer les neurones entériques de façon IL-6-dépendante et les neurones myentériques *via* les voies de l'IL-6 et de l'IL-8 (Buhner *et al.*, 2009).

La mise en place d'une l'inflammation se fait suite à la reconnaissance de motifs moléculaires caractéristiques d'un agent pathogène (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou de signaux de danger venant de l'hôte (DAMP, *Danger Associated Molecular Pattern*) par des récepteurs de l'immunité innée appelés PRR (*Pattern Recognition Receptor*) tels que les TLR (*Toll Like Receptors*) ou les récepteurs NLR (*NOD-Like-Receptors*). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui reconnaissent différents motifs bactériens, parasitaires ou viraux. Dans le cadre du SII, l'expression et la fonction des TLRs sont modulées au niveau intestinal ou plasmatique (Lazaridis et Germanidis, 2018). Au niveau plasmatique, l'expression des TLR2, TLR4 et TLR5 est augmentée (Brint *et al.*, 2011; Jizhong *et al.*, 2016; Ohman *et al.*, 2012). A l'inverse, l'expression de TLR7 et de TLR8 est diminuée significativement chez les patients atteints de SII (Brint *et al.*, 2011). La modulation de l'expression des TLR2 et TLR4 au niveau plasmatique est corrélée à la dépression mais ne serait pas associée aux troubles du transit (Jizhong *et al.*, 2016; Ohman *et al.*, 2012). De plus, des anticorps dirigés contre les lipopolysaccharides (LPS) et la flagelline ont été détectés chez les patients souffrant de SII (Dlugosz *et al.*, 2015). La fonction des TLRs est également altérée au niveau plasmatique. Suite à l'administration d'agonistes spécifiques des TLR4, TLR5 et TLR8 chez des patients atteints de SII, les taux de cytokines pro-inflammatoires sont augmentés par rapport aux individus contrôles (McKernan *et al.*, 2011). Le même constat a été fait au niveau de la muqueuse intestinale. L'analyse de biopsies de patients atteints de SII montre en effet une augmentation significative de l'expression des TLR2 et TLR4 (Belmonte *et al.*, 2012; Koçak *et al.*, 2016). Cependant, Belmonte *et al.*, concluent que cette expression est associée au SII-M et corrélée à la durée des symptômes (Belmonte *et al.*, 2012). Par ailleurs, depuis quelques années l'implication des récepteurs NLRs dans le développement du SII est discutée (Ringel-Scaia *et al.*, 2016). Peu d'études cliniques ont été réalisées mais l'analyse de biopsies a montré une augmentation du nombre de cellules activées par la caspase-1 suggérant une altération de la fonction des NLRs chez les patients (Liu *et al.*, 2016).

### 3. Perturbations du microbiote intestinal

Le tractus intestinal abrite une importante communauté microbienne appelée microbiote intestinal qui est composée de bactéries, d'archées, de virus, de protozoaires et de champignons. Chez l'Homme, ce microbiote intestinal comprend environ  $10^{14}$  micro-organismes avec une prédominance de bactéries (Backhed *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006). Au cours des quinze dernières années, les avancées considérables des technologies de séquençage à haut débit ont contribué à l'amélioration des connaissances sur la composition, la diversité et le rôle du microbiote intestinal. Plus récemment, l'avènement des techniques « omics » a permis des avancées majeures concernant les fonctions du microbiote intestinal grâce notamment au projet américain « *Human Microbiome Project* », et au projet européen MetaHIT (*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) (Dusko Ehrlich et MetaHIT consortium, 2010; Human Microbiome Project Consortium, 2012). Le colon abrite la population la plus abondante de micro-organismes du tractus intestinal, avec environ  $10^{11}$  bactéries/g, constituée à 80 % d'espèces anaérobies strictes appartenant à trois phyla principaux, les *Bacteroidetes* (30-40%), les *Firmicutes* (60-70%) et les *Actinobacteria* (Neish, 2009). Il existe néanmoins d'importantes variations interindividuelles, qualitatives (nature des espèces bactériennes) et quantitatives (abondances relatives de ces espèces). Si ces variations interindividuelles sont en partie liées à la génétique de l'hôte, des facteurs environnementaux, tels que l'alimentation ou des infections par des agents pathogènes peuvent aussi moduler la composition du microbiote (Lozupone *et al.*, 2012), et être ainsi à l'origine d'un déséquilibre de la microflore intestinale appelé dysbiose intestinale (Icaza-Chávez, 2013). Ces altérations du microbiote intestinal, nommées dysbioses intestinales sont constatées dans de nombreuses pathologies et notamment dans le cas du SII.

Depuis quelques années la place du microbiote dans la physiopathologie du SII est largement décrite. La modulation de sa composition par différents facteurs tels que le stress, l'alimentation, les antibiothérapies mais également les infections gastro-intestinales est un facteur de risque dans le développement de cette pathologie. La dysbiose induite peut alors avoir des répercussions intestinales (altération de la barrière épithéliale, activation du système immunitaire, troubles de la motilité) mais également centrales (comorbidités et hypersensibilité viscérale) faisant du microbiote intestinal, un acteur central dans la pathogénèse.

### 3.1. Altérations de la composante bactérienne

#### 3.1.1. Altérations de la composition

De nombreuses études décrivent une dysbiose intestinale chez les patients atteints de SII. Bien que les résultats soient hétérogènes, le microbiote semble donc jouer un rôle important dans la pathologie. La modulation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* est un indicateur de la perturbation de la composition du microbiote intestinal. Dans la littérature, ce ratio pourrait être augmenté (Jeffery *et al.*, 2012; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2011; Tana *et al.*, 2010; Tap *et al.*, 2017) ou diminué (Jalanka-Tuovinen *et al.*, 2014; Pozuelo *et al.*, 2015) chez les patients souffrant de SII. Plusieurs hypothèses méthodologiques ont été avancées pouvant expliquer cette divergence de résultats: le choix des amorces utilisées pour l'amplification d'une région variable du gène de l'ARNr 16S, la méthode d'extraction d'ADN, le faible nombre de patients atteints de SII inclus dans l'étude, le sous-type de SII diagnostiqué ou encore la sévérité de la pathologie.

De manière générale, les études montrent une augmentation de l'abondance relative de bactéries pro-inflammatoires incluant la famille des *Enterobacteriaceae* et inversement une réduction de l'abondance relative des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Duboc *et al.*, 2012; Kerckhoffs *et al.*, 2009; Parkes *et al.*, 2012; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2017). Ces deux genres bactériens sont capables d'interagir avec d'autres espèces bactériennes mais également l'hôte entraînant une modulation du microbiote et de la réponse immunitaire. De nombreuses espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont aussi capables de produire des peptides antimicrobiens. Des études *in vitro* ont montré l'effet bactéricide de ces peptides contre des agents pathogènes tels que *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes* (Angelakis *et al.*, 2013). De plus, les lactobacilles et la bifidobactéries modulent la réponse immunitaire *via* le développement d'une tolérance immunitaire au contact d'une lectine de type C (CD209 ou DC-SIGN) présent sur les cellules dendritiques permettant la production d'IL-10 (Konstantinov *et al.*, 2008; Pace *et al.*, 2015; Taverniti et Guglielmetti, 2011). Cependant, des résultats contradictoires ont été récemment rapportés. L'abondance relative du genre *Lactobacillus* et plus globalement de l'ordre des *Lactobacillales* serait notamment augmentée chez les patients atteints de SII (Labus *et al.*, 2017; Rigsbee *et al.*, 2012; Tana *et al.*, 2010). Cette augmentation de l'abondance relative des *Lactobacillus* serait à l'origine de taux élevés d'acide acétique qui ont été associés à la sévérité des douleurs abdominales et des ballonnements (Tana *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'espèce *Feacalibacterium prauznitsii* et le genre *Bifidobacterium*, les familles des *Ruminococcaceae* et des *Erysipelotrichaceae* et l'ordre des *Clostridiales* sont des bactéries productrices d'AGCC qui sont connus pour être impliqués dans l'homéostasie intestinale. Plusieurs études ont mis en évidence une réduction de l'abondance relative ces bactéries chez les patients atteints de SII (Lyra *et al.*, 2009; Pozuelo *et al.*, 2015; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2011; Rigsbee *et al.*, 2012; Saulnier *et al.*, 2011; Tana *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2017). De plus, une modulation de l'abondance relative d'autres genres bactériens a également été démontrée dans d'autres études. On peut par exemple citer une augmentation de l'abondance relative des *Veillonella* (Malinen *et al.*, 2005; Rigsbee *et al.*, 2012; Tana *et al.*, 2010), des *Ruminococcus* (Lyra *et al.*, 2009; Malinen *et al.*, 2005; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2011; Saulnier *et al.*, 2011) notamment *R. gnavus* et *R. torques* qui sont capables de dégrader le mucus (Ringel et Ringel-Kulka, 2015). Une augmentation de l'abondance relative des *Bacteroides* (Jeffery *et al.*, 2012; Parkes *et al.*, 2012; Ponnusamy *et al.*, 2011; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2011) ainsi que des *Streptococcus* qui peuvent conduire à la production d'IL-6 (Jalanka-Tuovinen *et al.*, 2014) a également été constatée. Plus récemment, l'augmentation de l'abondance relative du genre *Prevotella* a été associée au développement d'un SII de type D (Su *et al.*, 2018).

De manière intéressante, l'augmentation de l'abondance relative de bactéries sulfato-réductrices productrices de sulfure d'hydrogène a été caractérisée chez les patients atteints de SII (Crouzet *et al.*, 2013). Par ailleurs le méthane a lui été associé au développement d'un SII. La production de méthane se limite au règne des Archées et notamment à l'ordre des *Methanobacteriales* chez l'Homme. L'augmentation des taux de méthane chez les patients atteints de SII-C se caractérise par la présence de *Methanobacteriales* associées à l'augmentation de l'abondance relative de l'ordre des *Clostridiales* se traduisant par un ralentissement du transit (Falony *et al.*, 2016; Jahng *et al.*, 2012; Pimentel *et al.*, 2006b; Tap *et al.*, 2017; Vandeputte *et al.*, 2016). De plus, la sévérité des symptômes est corrélée positivement à la présence de ces archées et une augmentation de l'abondance de bactéries appartenant à l'ordre des *Clostridiales* ou au genre *Prevotella* (Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018).

### 3.1.2. Altération du métabolome

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans la dégradation des composants non digestibles ingérés (Cummings et Macfarlane, 1997). La fermentation des carbohydrates est nécessaire en raison des effets bénéfiques des principaux produits de fermentation comme les

AGCC importants pour le maintien de l'homéostasie intestinale (Hamer *et al.*, 2007). En effet, les AGCC notamment l'acétate, le butyrate et le propionate sont impliqués dans le maintien de la barrière épithéliale ainsi que dans la mise en place d'une tolérance immunitaire (**Figure 7**) (Tan *et al.*, 2014). Les données de la littérature révèlent une modulation de la quantité de ces AGCC chez les patients atteints de SII (Farup *et al.*, 2016; Gargari *et al.*, 2018; Treem *et al.*, 1996; Valeur *et al.*, 2015) mais les résultats sont parfois contradictoires (Tana *et al.*, 2010). Certaines études montrent en effet une diminution de la production de ces AGCC qui est associée à une baisse de l'abondance relative des bactéries qui les produisent (Voir partie 3.1.2. Altération de la composition du microbiote), alors que d'autres études indiquent que les quantités d'AGCC sont fortement augmentées chez les patients atteints de SII avec une augmentation de l'abondance de plusieurs bactéries productrices d'AGCC telles que *Roseburia*, *Blautia* et *Veillonella* (Rajilić-Stojanović et de Vos, 2014).

D'autres bactéries utilisant les carbohydrates peuvent être à l'origine de la production de gaz. Une surproduction de gaz est associée au SII ce qui expliquerait les ballonnements et les douleurs abdominales (King *et al.*, 1998). La production excessive de gaz peut également accélérer le transit comme décrit chez les patients atteints de SII-D (Pritchard *et al.*, 2014). Ces gaz comme le dihydrogène peuvent être convertis par les Archaeobactéries et être transformés en méthane qui est connu pour ralentir le transit intestinal. Ainsi, de faibles taux de méthane ont été mesurés chez les patients atteints de SII-D alors que de fort taux sont retrouvés chez les patients atteints de SII-C (Kim *et al.*, 2012; Pimentel *et al.*, 2006b; Tap *et al.*, 2017).

Parallèlement, des études rapportent une augmentation de la quantité de protéases dans les fèces et les surnageants de biopsies coliques de patients atteints de SII (Buhner *et al.*, 2009; Cenac *et al.*, 2007; Róka *et al.*, 2007). Les protéases à cystéine ou à sérine sont impliquées dans l'augmentation de la perméabilité intestinale (réorganisation des jonctions serrées) mais également dans l'activation neuronale et donc dans l'HSVC. De plus, leur activité a été corrélée à la sévérité des symptômes et à la perception douloureuse (Annaházi *et al.*, 2013; Steck *et al.*, 2012). La dégradation des protéines génère de nombreuses substances telles que du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) qui peut également être produit par différents genres bactériens tels que le genre *Prevotella*. L'H<sub>2</sub>S, peut favoriser la croissance certaines bactéries pathogènes appartenant à l'ordre des *Gammaprotéobacteria* dont l'abondance est augmentée chez les patients atteints de SII (Thiennimitr *et al.*, 2011; Weissfeld et Sonnenwirth, 1982). De plus, il peut aller directement



activer les canaux présents sur les FAP et induire un message nociceptif (Fukami *et al.*, 2017; Smith, 2009).

Jusqu'à 90% de la sérotonine (5-HT) corporelle est produite par les cellules entérochromaffines présentes au niveau du tractus gastro-intestinal. La 5-HT régule entre autre la motilité intestinale (Spiller, 2008). De plus, il a été identifié que certaines bactéries appartenant la classe des *Clostridiales* sont également capables de produire de la 5-HT (Rajilić-Stojanović et de Vos, 2014). Cette piste est actuellement peu étudiée et d'autres études sont nécessaires pour mettre en évidence un lien éventuel entre la sérotonine d'origine bactérienne et la physiopathologie du SII.

### 3.2. Altérations de la composante microbienne eucaryote

#### 3.2.1. Champignons

Le règne des *Fungi* plus communément appelés champignons est un composant très minoritaire (0.1%) du microbiote intestinal que l'on nomme mycobiote (Arumugam *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2015; Underhill et Iliev, 2014). De ce fait, le mycobiote intestinal est très peu étudié dans le cadre du SII. Malgré cette faible proportion, de récentes études ont mis en évidence certaines communautés fongiques impliqués dans le développement de MICI (Chehoud *et al.*, 2015; Iliev *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2015; Sokol *et al.*, 2017). De plus, des études *in vitro* ont montré que *Candida albicans* est capable d'activer les mastocytes (Lopes *et al.*, 2015; Nieto-Patlán *et al.*, 2015). Ces résultats ont alors conduit à l'évaluation d'un profil fongique chez les patients atteints de SII. Dans cette étude, le mycobiote fécal a été étudié chez des patients atteints de SII classés normo-sensibles (ne présentant pas d'HSVC) ou hypersensibles (présentant une HSVC) en comparaison avec des individus sains (Botschuijver *et al.*, 2017). Le mycobiote fécal des individus sains se compose à 57% des espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. Ce pourcentage s'élève à 76 chez les sujets hypersensibles et à 83% chez les sujets normo-sensibles. Ainsi, chez les patients atteints de SII, on observe une augmentation significative de l'abondance relative de ces deux levures qu'ils soient normo-sensibles ou hypersensibles. De plus, l' $\alpha$ -diversité qui représente la diversité mesurée au sein d'un échantillon donné (nombre d'espèces qui cohabitent au sein de cet échantillon), est diminuée chez les patients atteints de SII en comparaison aux sujets contrôles. Dans cette même étude, les

expérimentations réalisées chez l'animal ont révélé que l'HSVC induite lors d'un stress néonatal par séparation maternelle pouvait être réduite par l'utilisation d'antifongiques (Botschuijver *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent donc une implication de certaines communautés fongiques dans la genèse des symptômes du SII. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats mais également d'évaluer les perturbations éventuelles du microbiote en fonction des différents sous-types de SII.

### 3.2.2. Protozoaires

Comme décrit dans le chapitre 1, certains protozoaires ont été spécifiquement retrouvés chez les patients atteints de SII et peuvent être à l'origine du développement des symptômes dans le cadre du SII-PI (Stark *et al.*, 2007). On peut également supposer que l'infection parasitaire pourrait être non pas la cause mais une conséquence de la dysbiose intestinale observée. En effet, la dysbiose intestinale pourrait participer à la mise en place d'un microenvironnement propice à l'implantation de certains protozoaires ce qui expliquerait leur forte prévalence chez certains patients atteints de SII.

#### ❖ *Giardia duodenalis*

*Giardia duodenalis* est un protozoaire flagellé dont la prévalence varie entre 2 et 5% dans les pays industrialisés et peut atteindre 20 à 30% dans les pays en développement (Ortega et Adam, 1997). Ce parasite est l'agent responsable de la giardiose se traduisant par des diarrhées et des douleurs abdominales (Ankarklev *et al.*, 2010). Il est désormais bien établi que les répercussions intestinales induites lors de l'infection par *Giardia* est un facteur impliqué dans la genèse du SII (D'Anchino *et al.*, 2002; Dormond *et al.*, 2016; Hanevik *et al.*, 2014). En effet, des études longitudinales sur 3, 6 et 10 ans ont révélé une persistance des douleurs abdominales plusieurs années après la résolution de l'infection (Litleskare *et al.*, 2018; Nakao *et al.*, 2017; Wensaas *et al.*, 2012). De plus, des études épidémiologiques rapportent également une plus forte prévalence de ce parasite chez les patients atteints de SII (Jadallah *et al.*, 2017).

❖ *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium parvum* est un protozoaire responsable de la cryptosporidiose dont les symptômes sont assez similaires à ceux du SII. En effet, l'infection par ce protozoaire se manifeste par des diarrhées, des nausées, des vomissements et/ou des douleurs abdominales (Collinet-Adler et Ward, 2010; Laurent *et al.*, 1999). La prévalence de *Cryptosporidium* varie de 0,26 à 22% dans les pays industrialisés et entre 1 et 45% dans les pays émergents (Collinet-Adler et Ward, 2010). A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées à l'impact de ce parasite dans le SII. Une étude a montré une plus forte prévalence de ce parasite chez les patients atteints de SII (Jadallah *et al.*, 2017).

❖ *Dientamoeba fragilis*

*Dientamoeba fragilis* est un protozoaire intestinal dont la pathogénicité reste controversée. Malgré un portage souvent asymptomatique certains individus développent des troubles intestinaux tels que des diarrhées, des douleurs abdominales ou une perte de poids (Stark *et al.*, 2007). Une plus forte prévalence de ce parasite est observée chez les patients atteints de SII indépendamment du sous-type (Ibrahim *et al.*, 2018; Nourrisson *et al.*, 2014a; Yakoob *et al.*, 2010a). Cependant, il existe une forte disparité entre les résultats. En effet, certaines études ne décrivent pas de différence de prévalence entre les patients atteints de SII et les individus contrôles (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2012; Krogsgaard *et al.*, 2015; Rostami *et al.*, 2017). De plus, l'éradication de ce parasite ne conduit pas à la réduction des douleurs abdominales (Engsbro *et al.*, 2012b; de Jong *et al.*, 2014; Röser *et al.*, 2014).

❖ *Blastocystis*

*Blastocystis* est le protozoaire intestinal le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme, mais son rôle en santé humaine est encore débattu. De manière intéressante, de nombreuses études se sont intéressées à la prévalence de ce micro-organisme chez les patients atteints de SII et suggèrent qu'il pourrait être à l'origine ou contribuer au développement de cette pathologie. Cet aspect sera discuté dans le chapitre suivant.

## Synthèse

L'étiologie multifactorielle du SII rend donc la physiopathologie complexe. De nombreuses perturbations centrales ainsi que des altérations gastro-intestinales ont été décrites chez les patients atteints du SII (Figure 8).

On note au niveau central des troubles de la cognition, des comorbidités (anxiété et dépression) et une perturbation de l'axe HHS. La production de cortisol par l'axe HHS en réponse à un stress peut moduler l'environnement colique notamment la composition du microbiote, l'intégrité de la barrière épithéliale, l'activation du système immunitaire ainsi que la motilité.

Au niveau intestinal, on répertorie une perturbation de la perméabilité intestinale, une activation du système immunitaire et une dysbiose intestinale pouvant conduire au développement d'une hypersensibilité viscérale d'origine colique. L'augmentation de la perméabilité intestinale peut conduire au passage de métabolites bactériens capables d'activer le système immunitaire, qui en réponse, va produire des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines peuvent alors moduler la composition du microbiote et la barrière intestinale. Elles peuvent également induire une HSVC *via* leurs récepteurs présents sur les fibres afférentes primaires (FAP) et moduler la composante centrale *via* la circulation sanguine. Les mastocytes semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie du SII. Leur activation caractérisée par la production d'histamine et de protéases peut moduler la motilité, la perméabilité intestinale et induire une HSVC *via* le clivage des récepteurs PAR-2 présents sur les FAP. Les patients atteints de SII présentent également une dysbiose intestinale. L'altération du métabolome intestinal peut avoir des répercussions sur la barrière épithéliale, le système immunitaire, l'induction d'une HSVC ainsi que des atteintes centrales *via* la circulation sanguine. Enfin, 90% de la sérotonine est produite par les cellules entérochromaffines. La sécrétion de sérotonine peut favoriser le développement d'une HSVC mais également les comorbidités.

Ainsi de nombreux mécanismes physiopathologiques peuvent conduire au développement de douleurs abdominales, des troubles du transit et des comorbidités psychiatriques chez les patients atteints de SII.

---

## Chapitre 3: *Blastocystis*, un nouvel acteur dans le SII ?

---

*Blastocystis* est un protozoaire intestinal anaérobie colonisant le tractus digestif de l'Homme et de nombreux animaux. Sa répartition géographique est mondiale, avec une prévalence variable selon les pays de 5% dans les pays industrialisés jusqu'à 60% dans les pays en développement. *Blastocystis* est classé en 17 sous-types (ST) dont 10 ont été répertoriés chez l'Homme. Malgré que ce soit le parasite le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme, son rôle en santé humaine est très controversé. De nombreuses études épidémiologiques ont pourtant rapporté de plus fortes prévalences de *Blastocystis* chez des patients atteints de différentes pathologies. Plusieurs données expérimentales menées *in vitro* et/ou *in vivo* suggèrent également un pouvoir pathogène de ce parasite.

### 1. Taxonomie et diversité génétique

#### 1.1. Taxonomie

Au siècle dernier, la taxonomie de *Blastocystis* a été largement contestée. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, ce micro-organisme est décrit au premier abord comme une levure de par son aspect morphologique proche des champignons et de son mode de division par fission binaire. Il fut nommé *Blastocystis enterocola* par Aliexieff en 1911 avant que Brumpt en 1912 ne le renomme *Blastocystis hominis* du fait de sa présence dans les selles humaines. Ce n'est qu'en 1967 que *Blastocystis* est classé parmi les protozoaires sur des critères morphologiques et physiologiques tels que l'absence de croissance sur des milieux fongiques, une résistance aux fongicides et une sensibilité à différentes molécules antiparasitaires (Zierdt, 1988).

L'essor des approches moléculaires basées sur le séquençage partiel du gène de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomique (ARNr 18S) a permis de montrer que *Blastocystis* n'était ni affilié aux levures ni aux *Sarcodines* (Johnson *et al.*, 1989). Une nouvelle classification a alors été

proposée en 1993 avec la création un nouveau sous-phylum, *Blastocysta*, au sein duquel on trouve la classe *Blastocystea*, l'ordre *Blastocystida*, la famille *Blastocystidae*, le genre *Blastocystis* et l'espèce *Blastocystis hominis* (Jiang et He, 1993). Cependant, l'analyse de la séquence complète du gène de l'ARNr 18S qui a permis d'élucider la classification de *Blastocystis*. En effet, en 1996 Silberman *et al.*, replacent *Blastocystis* au sein des Straménopiles (Silberman *et al.*, 1996). Les Straménopiles regroupent divers micro-organismes tels que des organismes unicellulaires, hétérotrophes ou phototrophes, qu'ils soient libres comme les diatomées et les algues brunes ou parasites comme les oomycètes (Silberman *et al.*, 1996). *Blastocystis* émerge au sein des Straménopiles hétérotrophes et est phylogénétiquement proche de *Proteromonas lacertae*, un Straménopile anaérobie colonisant le tractus digestif des lézards (**Figure 9**). Il est cependant intéressant de noter que *Blastocystis* est le seul Straménopile capable de coloniser le tube digestif des mammifères et de présenter un stade kystique au cours de son cycle de vie. Une étude publiée en 2002 est venue confirmer l'appartenance de *Blastocystis* aux Straménopiles sur la base d'analyses phylogénétiques de la séquence codant la protéine HSP7 (Arisue *et al.*, 2002).

## 1.2. Diversité génétique

Les isolats de *Blastocystis* retrouvés chez l'Homme et les animaux sont morphologiquement similaires. Ainsi, plusieurs espèces ont été décrites en fonction de leur hôte d'origine: *Blastocystis hominis* chez l'Homme, *Blastocystis ratti* chez le rat ou encore *Blastocystis pythoni* chez le python (Boreham et Stenzel, 1993; Stenzel et Boreham, 1996; Tan, 2004, 2008a). Cependant, l'analyse du gène codant l'ARNr 18S a révélé que des isolats humains étaient génétiquement identiques aux isolats observés chez les animaux confirmant le potentiel zoonotique et la faible spécificité d'hôtes. Ces résultats ont aussi montré une large diversité génétique au sein du genre *Blastocystis* (Noel *et al.*, 2005).

La classification actuelle repose sur une séquence d'environ 600 nucléotides du gène codant l'ARNr 18S (Scicluna *et al.*, 2006). Stenvold *et al.*, ont proposé en 2007 de nommer chaque isolat identifié par *Blastocystis* suivi d'un numéro de sous-types (ST) (Stensvold *et al.*, 2007). Depuis la normalisation de la terminologie, 17 sous-types ont été mis en évidence dont 10 ont été retrouvés chez l'homme (ST1-ST9, et ST12) (Alfellani *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2014).

## 2. Morphologie

Ce micro-organisme est caractérisé par un important polymorphisme au cours de son cycle de vie. En effet, pas moins de quatre formes majoritaires ont été décrites dans la littérature sur la base d'observations microscopiques de selles fraîches humaines et/ou de cultures du parasite *in vitro*.

### 2.1. Forme vacuolaire

La forme vacuolaire est la forme la plus fréquemment retrouvée dans les échantillons de selles et les cultures *in vitro* (Tan, 2008; Zhang *et al.*, 2012). De forme sphérique, sa taille varie de 3 à 120µm, pour une moyenne de 15µm (Parija et Jeremiah, 2013). Ces variations de taille peuvent être observées entre différents ST mais aussi au sein d'un même isolat appartenant à un même ST. La forme vacuolaire est principalement caractérisée par une large vacuole qui occupe environ 90% du volume cellulaire. Cette vacuole repousse le cytoplasme et les organites en périphérie de la cellule (Parija et Jeremiah, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Le cytoplasme contient un ou deux noyaux. L'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et des organites apparentés aux mitochondries (dénommés MLO- *Mitochondria-Like Organelles*) entourent le noyau dans cet espace confiné (Parija et Jeremiah, 2013). La vacuole contient des carbohydrates et des lipides qui participeraient à la croissance cellulaire (Yoshikawa *et al.*, 1995). Un important glycocalyx est présent à la surface du parasite (Parija et Jeremiah, 2013; Zaman *et al.*, 1997; Zierdt, 1991). Il pourrait intervenir dans l'adhérence du parasite au mucus recouvrant l'épithélium intestinal et/ou être impliqué dans l'absorption de nutriments (Cassidy *et al.*, 1994; Zaman *et al.*, 1997, 1999). Ce dernier phénomène expliquerait la faible épaisseur de ce glycocalyx chez les formes parasitaires en culture *in vitro*, qui serait ainsi liée à la présence en excès de nutriments dans le milieu (Parija et Jeremiah, 2013). A l'heure actuelle, la forme vacuolaire est le seul stade décrit comme étant capable de se diviser et seulement par fission binaire (Tan, 2008).

### 2.2. Forme granulaire

La forme granulaire est essentiellement observée après de nombreux passages en culture *in vitro*. La forme granulaire ressemble à la forme vacuolaire mais elle possède de nombreux granules au sein de sa vacuole centrale et parfois dans son cytoplasme (Parija et Jeremiah, 2013). Sa taille est légèrement plus petite que celle de la forme vacuolaire, et varie de 3 à 80 µm (Parija

et Jeremiah, 2013; Zierdt, 1973; Zierdt et Williams, 1974). L'aspect des vacuoles est très variable. L'analyse en microscopie électronique, révèle des granules très denses et d'autres qui semblent vides et qui s'apparentent à des gouttelettes lipidiques (Tan, 2008). Les granules denses joueraient un rôle dans les voies métaboliques du parasite. Enfin, les gouttelettes lipidiques pourraient être impliquées dans la croissance cellulaire (Dunn *et al.*, 1989; Tan et Zierdt, 1973). Cependant, le rôle précis de cette forme granulaire dans le cycle du parasite n'est toujours pas établi.

### 2.3. Forme amiboïde

La forme amiboïde est rarement observée et son existence reste controversée. Sa taille moyenne est de 10µm et son aspect est irrégulier (Parija et Jeremiah, 2013; Tan et Zierdt, 1973). Tout comme la forme vacuolaire, on note la présence d'une large vacuole centrale ou de multiples vacuoles de plus petites tailles (Parija et Jeremiah, 2013; Tan et Suresh, 2006a; Tan *et al.*, 1996). Cette forme serait une étape intermédiaire avant l'enkystement pendant laquelle la dégradation de bactéries à des fins nutritionnelles favorisait la formation de kystes (Parija et Jeremiah, 2013; Singh *et al.*, 1995). Néanmoins, il n'y a aucune évidence quant à la capacité de *Blastocystis* à se nourrir de bactéries. Certains auteurs suggèrent que ces formes amiboïdes, cultivables sur milieu gélosé, seraient impliquées dans la pathogénicité du parasite (Tan et Suresh, 2006a, 2006b). En effet, la présence récurrente de cette forme dans les selles de patients symptomatiques conforte cette hypothèse.

### 2.4. Forme kystique

La forme kystique est la forme qui présente la plus petite taille ce qui la rend difficilement identifiable dans les selles. De forme sphérique ou ovoïde, les kystes ont une taille qui n'excède pas 10 µm dans les selles humaines (Parija et Jeremiah, 2013; Stenzel *et al.*, 1997; Zaman *et al.*, 1995). Cette forme n'est pas toujours observée dans les selles de patients infectés ce qui pourrait s'expliquer par l'existence de ST plus ou moins kystogènes. Cependant aucune étude n'a mis en évidence de relation entre la nature du ST et l'excrétion de kystes (Rene *et al.*, 2009). La paroi kystique est composée d'une couche interne séparée d'une couche externe par une bande fine opaque aux électrons. La paroi peut être recouverte d'une seconde couche externe composée de carbohydrates similaires à ceux décrits à la surface des formes vacuolaires (Moe *et al.*, 1996; Stenzel et Boreham, 1996). Le cytoplasme condensé referme un à quatre noyaux, de nombreux



MLO, du réticulum endoplasmique ainsi que de petites vacuoles contenant des lipides et du glycogène (Moe *et al.*, 1996; Stenzel et Boreham, 1996).

Les kystes peuvent survivre durant 1 mois à 25°C et 2 mois à 4°C (Moe *et al.*, 1996). Le passage de la forme kystique à la forme vacuolaire est observé entre 12 et 24 heures en culture *in vitro* (Moe *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent donc que cette forme correspondrait à la forme de résistance et de transmission du parasite.

### 3. Cycle parasitaire

Le cycle de vie de *Blastocystis* reste encore hypothétique. Le modèle actuellement proposé prend en compte le potentiel zoonotique de ce parasite. L'Homme et les animaux sont infectés suite à l'ingestion de kystes qui après dékystement, dans le tractus digestif de l'hôte, se transforment en formes vacuolaires. Les conditions et le lieu précis de dékystement ne sont actuellement pas connus. Le parasite va ensuite se multiplier par fission binaire. Dans le colon, les formes vacuolaires pourraient donner naissance aux formes amiboïdes et granulaires et/ou se ré-enkyster avant d'être excrétées dans l'environnement (**Figure 10**). Les kystes excrétés sont alors capable de résister et de contaminer un nouvel hôte humain ou animal par la voie oro-fécale lors de la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (Tan, 2008; Wawrzyniak *et al.*, 2013).

Le passage d'une forme à une autre est encore peu connu et les méthodes actuelles de culture *in vitro* de *Blastocystis* ne permettent pas de disposer de l'ensemble des formes parasitaires. Il est décrit que l'incubation de kystes isolées de selles humaines ou animales dans un milieu adapté favorise l'apparition de formes vacuolaires (Chen *et al.*, 1999; Moe *et al.*, 1999). Dans l'étude Moe *et al.*, un passage intermédiaire en formes granulaires serait nécessaire afin d'aboutir à la forme vacuolaire (Moe *et al.*, 1999). A contrario, il est montré que les conditions de culture pourraient favoriser le développement de formes granulaires à partir des formes vacuolaires (concentrations importantes en sérum, culture axénique, changement de milieu de culture...). Une autre étude a montré que les kystes incubés en milieu de Jones pouvaient se développer en formes vacuolaires et granulaires sans toutefois savoir laquelle découle de l'autre (Zaman *et al.*, 1999). Concernant la forme amiboïde, il est décrit que l'ensemencement de formes vacuolaires sur gélose favorise leur développement.

#### 4. Méthode de détection

Des approches de diagnostics directs et indirects ont été développées pour mettre en évidence l'infection par *Blastocystis*. Les méthodes directes regroupent les techniques basées à la fois sur l'aspect morphologique (microscopie) et la détection d'ADN (PCR, qPCR...) ou d'antigènes (ELISA- *enzyme linked immunosorbent assay*, immunohistochimie...) alors que les méthodes indirectes sont basées sur la détection dans les sérums des hôtes infectés d'anticorps dirigés contre le parasite. La sensibilité de ces techniques varie considérablement induisant souvent une sous-estimation de la prévalence de *Blastocystis*.

##### 4.1. Microscopie directe

Le diagnostic en microscopie optique à partir d'un examen direct des selles des patients, est la méthode la plus couramment utilisée pour détecter *Blastocystis*. Néanmoins, le diagnostic de *Blastocystis* pose un réel problème. En effet, la controverse quant à son rôle en santé humaine fait qu'il est généralement négligé et qu'il n'est pas recherché de façon systématique dans les laboratoires hospitaliers. Compte tenu de son polymorphisme, de l'altération provoquée par les conditions environnementales ou des traitements médicamenteux, le risque de confondre *Blastocystis* avec d'autres micro-organismes est avéré et l'examen microscopique des selles de patients semble avoir entraîné une sous-estimation de sa prévalence (Leelayoova *et al.*, 2002; Suresh et Smith, 2004; Termmathurapoj *et al.*, 2004). De plus, la forme vacuolaire qui est la plus facilement identifiable reste minoritaire dans les échantillons de selles humaines, contrairement aux kystes qui représentent la forme majoritaire dans les selles mais qui, du fait de leur petite taille, restent difficilement identifiables (Tan, 2004, 2008). Le diagnostic en microscopie nécessite généralement une coloration afin d'améliorer la sensibilité du diagnostic microscopique. Les principales colorations utilisées pour les observations directes sont le lugol-iodine, le Giemsa et le trichrome (Stensvold et Clark, 2016a; Tan, 2008a), cette dernière étant la plus utilisée (Stensvold *et al.*, 2007; Tan, 2008). La mise en culture des selles de patients sur une courte durée accroît la sensibilité de la détection par la coloration au trichrome ou au lugol (Tan, 2008). Dans le cas d'une co-infection par plusieurs ST, les différents STs de *Blastocystis* ne peuvent pas être différenciés microscopiquement et la mise en culture favorise souvent le développement d'un ST majoritaire (Tan, 2008). Les laboratoires hospitaliers ont parfois recours aux techniques de concentration des selles mais ces techniques ont l'inconvénient d'altérer ou de provoquer la lyse des formes vacuolaires (Tan, 2008). Afin d'augmenter la

sensibilité de détection, des étapes de concentration par centrifugation en gradient de densité sont souvent nécessaires (Suresh et Smith, 2004; Tan, 2008a). La charge parasitaire peut-être estimée en comptant le nombre de kystes par champ, contribuant ainsi à l'interprétation clinique de la présence du parasite. En effet, certaines études établissent une corrélation entre la présence abondante de cellules parasitaires (plus de 5 parasites par champs) et l'apparition de troubles digestifs en l'absence de toute autre étiologie (Tan, 2008). Pourtant, de nombreuses études critiquent cette corrélation et expliquent la présence de symptômes par d'autres facteurs tels que l'âge ou des facteurs génétiques.

#### 4.2. Culture xénique des selles

La mise en culture xénique des selles de patients s'est avérée une méthode de choix compte tenu de sa plus grande sensibilité comparativement à l'examen direct des selles en microscopie. Une culture xénique se définit par la culture d'un micro-organisme en présence d'une flore bactérienne non contrôlée. *Blastocystis* peut être cultivé dans différents milieux de culture tels que le milieu de Robinson (diphase), le milieu de Jones ou le milieu LYSGM dérivé du TSGM-9 (Clark et Diamond, 2002; Leelayoova *et al.*, 2002). De par sa simplicité et son faible coût, le milieu de Jones est le plus couramment utilisé pour identifier et maintenir différents ST de *Blastocystis* isolés à partir d'échantillons de selles. Ce milieu permet le dékystement et la prolifération du parasite sous sa forme vacuolaire après 24 heures de culture. Cependant cette méthode présente quelques inconvénients dont le principal est la difficulté à mettre en culture certains isolats dont le ST3 en milieu de Jones (Jones *et al.*, 2008; Parkar *et al.*, 2007; Tan, 2008a). De plus, le temps de multiplication étant variable selon les ST, cette méthode sous-estime les cas de co-infection (Tan *et al.*, 2010).

#### 4.3. Recherche de copro-antigènes

Un test rapide de détection d'antigènes dans les selles (Copro ELISA *Blastocystis*, Savyon Diagnostics, Israël) a été récemment commercialisé. Il présente de bonnes performances en termes de sensibilité en comparaison à un examen microscopique direct suite à une coloration au lugol. Néanmoins, sa sensibilité (92%) est assez proche de celle du diagnostic par mise en culture. De plus, il ne permet pas de cibler l'intégralité des ST humains, puisque seuls les ST1, ST2, ST3 et ST5 sont détectés (Dogruman-Al *et al.*, 2015). Ainsi, il ne serait pas pertinent

d'utiliser ce test en Europe où le ST4, qui n'est pas détecté par cette approche, est majoritaire dans plusieurs régions.

#### 4.4. Biologie moléculaire

Le diagnostic moléculaire de *Blastocystis* repose sur la PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques ciblant l'ARNr 18S a été privilégiée, permettant ainsi le génotypage des différents ST. Plusieurs études ont montré la nette supériorité de cette approche moléculaire, en termes de sensibilité et de spécificité comparée à l'examen microscopique et la culture xénique des selles. La première PCR quantitative (qPCR), utilisant du SYBR green, a été développée en 2008. L'amplification d'un fragment de 152 nucléotides ne permet d'identifier que les sous-types ST1 ST3 et ST4 (Jones *et al.*, 2008). La deuxième qPCR décrite en 2011, utilisant également du SYBR green, permet d'amplifier un fragment d'environ 339 nucléotides du gène codant l'ARNr 18S (Poirier *et al.*, 2011). Elle présente l'avantage de permettre un sous-typage direct par séquençage des produits d'amplification et a été validée pour les sous-types ST1 à ST9. La troisième méthode, publiée en 2012 par Stensvold *et al.*, est la première à utiliser une sonde TaqMan. Elle cible une région de 190 nucléotides du gène codant l'ARNr 18S et permet de détecter tous les STs humains (Stensvold *et al.*, 2012). Enfin en 2014, Dagci *et al.*, ont mis au point une qPCR, utilisant également la technologie Taq man et ciblant une portion d'environ 359 nucléotides du gène codant l'ARNr 18S (Dagci *et al.*, 2014). Cette qPCR a été validée sur une cohorte turque et a permis de détecter les sous-types ST1, ST2, ST3, ST6 et ST7. Malgré sa forte sensibilité, le diagnostic moléculaire n'est pas utilisé en routine du fait de son coût élevé pour un parasite dont la pathogénicité reste encore aujourd'hui très controversée.

#### 4.5. Analyses sérologiques

L'infection par *Blastocystis* conduit à la production d'Immunoglobulines G et A (IgG et IgA) qui peuvent être détectées par des techniques immunologiques telles que l'immunofluorescence indirecte ou ELISA (Garavelli *et al.*, 1995; Mahmoud et Saleh, 2003; Zierdt *et al.*, 1995). Les premières études par ELISA ont décrit une forte concentration d'IgG chez les individus porteurs de *Blastocystis*. Un titre élevé en IgG serait prédictif de patients symptomatiques (Zierdt et Nagy, 1993). En revanche, la présence d'IgA n'a pas été corrélée avec la sévérité de l'infection. Cependant, la présence de ces deux isotypes reste controversée.

En effet, une étude rapporte la présence d'IgA et d'IgG seulement chez les patients symptomatiques alors qu'une autre étude décrit la présence d'anticorps également chez les patients asymptomatiques (Kaneda *et al.*, 2000; Mahmoud et Saleh, 2003). Compte tenu de la disparité des résultats et du manque d'information quant à la réponse de l'hôte, le diagnostic sérologique n'est pas utilisé en routine.

## 5. Epidémiologie

### 5.1. Prévalence

*Blastocystis* est le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé dans les selles humaines. Sa répartition est mondiale mais sa prévalence varie selon les pays ainsi qu'entre différentes régions d'un même pays (Tan, 2008; Tan *et al.*, 2010). La prévalence dans les pays en développement est plus élevée que dans les pays industrialisés. On estime la prévalence dans les pays industrialisés entre 1 et 23 % alors que celle dans les pays en développement varie autour de 60%. Une étude sénégalaise a même montré une prévalence de 100% au sein d'une cohorte de 93 enfants issus de différents villages (El Safadi *et al.*, 2013). Ce constat s'explique par les conditions d'hygiène ainsi que le contact avec un réservoir animal et/ou de l'eau contaminée. Cependant, les méthodes de détection varient ce qui entraîne une sous-estimation de la prévalence dans de nombreux cas (Poirier *et al.*, 2011).

### 5.2. Répartition des STs

Le ST le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme est le ST3 (Tan, 2008; Tan *et al.*, 2010; Wawrzyniak *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*) suivi par le ST1, le ST2 et le ST4 (**Figure 11**) (Stensvold *et al.*, 2009a). Cependant, cette répartition peut varier selon les régions du monde. En Asie, on retrouve majoritairement des STs dits *aviaires* (ST6 et ST7) à l'exception de la Thaïlande où le ST1 est retrouvé majoritairement. En Europe, le ST4 est largement représenté avec notamment de fortes prévalences en Espagne (Domínguez-Márquez *et al.*, 2009) et au Danemark (Olsen *et al.*, 2011). Des variations sont également décrites au sein d'un même pays, comme en France où une étude lilloise a rapporté une prédominance de ST3 (53.5%) alors

qu'une étude clermontoise a décrit une prévalence très élevée de ST4 (63%) (Poirier *et al.*, 2011; Souppart *et al.*, 2009). Des cas de co-infection par différents STs sont également fréquemment décrits. La prévalence de ces co-infections a été évaluée entre 2.6 et 14.3% et peut atteindre 22% (Li *et al.*, 2007; Meloni *et al.*, 2012; Scanlan *et al.*, 2015; Souppart *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2006). Ainsi, le ST1 est fréquemment associé au ST2 ou au ST3 (Tan, 2008).

En plus de cette diversité en fonction de la zone géographique, la répartition des STs varie aussi selon les espèces animales. *Blastocystis* possède un fort potentiel zoonotique, des ST identiques étant retrouvés dans différents groupes d'animaux, incluant les mammifères, les reptiles, les oiseaux, les batraciens ou les insectes (Cian *et al.*, 2017; Stensvold *et al.*, 2009a; Yoshikawa *et al.*, 2016). En dépit du fait qu'un même ST puisse être isolé dans différentes espèces animales, il existerait une certaine spécificité d'hôtes. Ainsi, les sous-types ST1 et le ST5 sont fréquemment retrouvés chez le porc alors que les sous-types ST5 et ST10 sont fortement prévalents chez les bovins (Stensvold *et al.*, 2009a). Le ST4 a été décrit préférentiellement chez les rongeurs (Katsumata *et al.*, 2018). Chez les primates, on retrouve essentiellement le ST1 et le ST3. Le ST8 est isolé communément chez les primates non humains et très rarement retrouvé chez l'Homme (Cian *et al.*, 2017). Chez les oiseaux, deux STs ont été décrits : ST6 et ST7 (Yoshikawa *et al.*, 2016). Ceci est d'autant plus intéressant que ces deux STs sont très proches phylogénétiquement sur la base du gène codant l'ARNr 18S. Curieusement, bien que ST9 soit également très proche de ces deux ST, il n'a jamais été retrouvé chez les oiseaux mais uniquement chez l'Homme.

## 6. Rôle en santé humaine

L'impact en santé humaine de *Blastocystis* est controversé du fait qu'il est fréquemment isolé de selles de patients asymptomatiques. Pourtant, différentes études épidémiologiques démontrent que *Blastocystis* serait, dans certaines situations, associé à la survenue de troubles digestifs. De ce fait, *Blastocystis* apparaît aujourd'hui comme un pathogène émergent et a été récemment ajouté à la liste des agents pathogènes à rechercher chez un donneur pour une TMF dans le cadre d'une infection à *Clostridium difficile* (Cammarota *et al.*, 2017).

## 6.1. Blastocystose

L'infection par *Blastocystis* est plus communément appelée blastocystose. De nombreux symptômes sont associés à cette infection allant de troubles gastro-intestinaux non spécifiques à des atteintes cutanées.

La blastocystose s'accompagne fréquemment de diarrhées et de douleurs abdominales (Stensvold *et al.*, 2009; Tan, 2008a; Tan *et al.*, 2010). D'autres symptômes gastro-intestinaux non spécifiques tels que des ballonnements, des nausées et la constipation peuvent être également retrouvés (Stensvold *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010). La sévérité des symptômes peut varier d'une simple diarrhée à une gastro-entérite aiguë en fonction de la charge parasitaire (Katsarou-Katsari *et al.*, 2008; Kaya *et al.*, 2007; Tan, 2008; Tan *et al.*, 2010). De plus, certaines études indiquent que la présence de symptômes serait liée au ST (Domínguez-Márquez *et al.*, 2009; Eroglu *et al.*, 2009; Stensvold *et al.*, 2009b; Stensvold *et al.*, 2009). Ces études suggèrent en effet que le ST1, ST4 et le ST7 sont des ST pathogènes alors que le ST2 et ST3 seraient responsables d'infections asymptomatiques (Eroglu *et al.*, 2009; Stensvold *et al.*, 2009).

Le dosage de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum des sujets porteurs de *Blastocystis* n'a pas révélé de modifications (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). De plus, le dosage de molécules jouant un rôle dans le stress oxydant a été réalisé et comme pour les cytokines aucun changement n'a été constaté (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). Il a cependant été rapporté une diminution des taux de calprotectine et d'IgA ainsi qu'une diminution des taux d'AGCC (acétate, propionate et butyrate) dans les selles des individus porteurs du parasite (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018).

Les études du microbiote intestinal chez des patients porteurs de *Blastocystis* ont révélé une augmentation de la richesse bactérienne (Andersen *et al.*, 2015; Audebert *et al.*, 2016; Nash *et al.*, 2017; Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). Par ailleurs, il existe une grande hétérogénéité des résultats concernant la composition du microbiote intestinal en cas d'infection (**Tableau 1**). Néanmoins, les études s'accordent à dire que *Blastocystis* pourrait être à l'origine d'une dysbiose intestinale chez l'Homme.

## 6.2. *Blastocystis* et Syndrome de l'intestin irritable

Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté une plus forte prévalence de *Blastocystis* spp. chez les patients souffrant de SII en comparaison avec des individus contrôles (Jimenez-Gonzalez et al., 2012; Nourrisson et al., 2014; Ragavan et al., 2015; Ramirez-Miranda et al., 2010; Rostami et al., 2017; Yakoob et al., 2004, 2010). Les différentes méta-analyses réalisées ont mis en évidence une association positive entre la présence de ce parasite et le SII (Nourrisson *et al.*, 2014; Rostami *et al.*, 2017). En effet, la prévalence de *Blastocystis* est deux fois plus importante chez les patients atteints de SII que chez des patients contrôles (Nourrisson *et al.*, 2014). Les sous-types retrouvés majoritairement chez les patients atteints de SII sont les sous-types ST1, ST3 et ST4 (Cifre *et al.*, 2018; Lepczyńska *et al.*, 2017).

Il a été montré que les taux d'IgG dirigés contre *Blastocystis* spp. sont significativement plus élevés chez des patients atteints du SII (Hussain *et al.*, 1997; Nagel *et al.*, 2015). A l'inverse, les taux d'IgA sont diminués chez les individus porteurs mais ne sont pas corrélés aux symptômes (Nagel *et al.*, 2015). De plus, les taux sériques d'IL-8, d'IL-3 et d'IL-5 sont fortement augmentés chez les patients atteints de SII et porteurs de *Blastocystis* en comparaison avec des patients souffrant de SII non porteurs ou d'individus porteurs asymptomatiques (Ragavan *et al.*, 2015; Yakoob *et al.*, 2014).

La présence d'une dysbiose intestinale a également été étudiée chez les patients atteints de SII porteurs ou non de *Blastocystis*. Nourrisson *et al.*, ont ainsi montré par qPCR que les patients souffrant de SII et porteurs du parasite étaient caractérisés par une abondance relative des bifidobactéries significativement diminuée comparé aux patients atteints de SII non porteurs de *Blastocystis* (Nourrisson *et al.*, 2014).

Devant ce constat, une recherche de ces parasites a été menée chez des groupes de patients souffrant d'autres syndromes digestifs. Ainsi, des études rapportent une prévalence significativement plus faible de *Blastocystis* chez des patients atteints de MICI par rapport à un groupe témoin (Mirjalali *et al.*, 2017; Rossen *et al.*, 2015).



### 6.3. *Blastocystis* et lésions cutanées

De nombreuses études associent l'infection par *Blastocystis* avec certaines lésions cutanées telles que l'urticaire (Tan *et al.*, 2010). Le ST le plus fréquent dans le cadre de ces lésions est le ST3 (Casero *et al.*, 2015; Kolkhir *et al.*, 2016; Zuel-Fakkar *et al.*, 2011). Certaines études associent le déclenchement de cet urticaire avec la présence de formes amiboïdes (Zuel-Fakkar *et al.*, 2011) et d'autres avec la présence de formes vacuolaires (Casero *et al.*, 2015). Cependant, l'utilisation d'antiparasitaires tend à réduire les symptômes (Gupta et Parsi, 2006; Kolkhir *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2010). Dans une étude rétrospective regroupant 80 patients souffrant de troubles gastro-intestinaux et porteurs de *Blastocystis* spp., 10% des sujets présentaient des manifestations cutanées (Bálint *et al.*, 2014).

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces symptômes demandent cependant à être élucidés. Certains auteurs suggèrent que *Blastocystis*, au même titre que les helminthes, induirait l'activation de lymphocytes Th2 et la production de cytokines pro-inflammatoires spécifiques (IL-3, IL-4, IL-5 et IL-13) qui provoqueraient une production d'IgE similaire à celle observée lors d'une réponse allergique. L'augmentation des mastocytes et des cellules mononucléées *in situ* entraînerait alors une libération d'histamine et d'autres médiateurs pro-inflammatoires (Kolkhir *et al.*, 2016; Pasqui *et al.*, ; Tan *et al.*, 2010).

### 6.4. *Blastocystis* et patients immunodéprimés

Les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) présentent une immunodépression importante. Ces patients sont donc plus susceptibles aux infections opportunistes telles que les infections parasitaires. *Blastocystis* est le protozoaire le plus fréquemment retrouvé chez ces patients entre 5 et 70 % selon les études (Hamad *et al.*, 2018; Kurniawan *et al.*, 2009), notamment le ST3 (Tan *et al.*, 2009). Cette infection opportuniste s'accompagne fréquemment de diarrhées chez le patient VIH positif.

Des cas d'infection ont été également décrits chez les transplantés rénaux (4.4% *vs* 2.2%), des patients splénectomisés (30% *vs* 13%) ou des patients atteints d'hémopathies malignes (13% *vs* 1%) (Azami *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 1998; Karasartova *et al.*, 2016; Rao *et al.*, 2003; Rasti *et al.*, 2017).

## 6.5. *Blastocystis* et cancer

*Blastocystis* est l'un des parasites les plus fréquemment retrouvés chez les patients atteints de cancer (7.7-13%) (Taşova *et al.*, 2000). Plusieurs études montrent en effet une plus forte prévalence du parasite chez des patients atteints de cancers du sang, du sein, des poumons, de cancer colorectal ou d'hémopathies malignes (Chandramathi *et al.*, 2012; Kumarasamy *et al.*, 2014; Mohamed *et al.*, 2017; Yersal *et al.*, 2016). De plus, il est aussi fréquemment retrouvé chez les patients ayant subi une chimiothérapie (Chandramathi *et al.*, 2012; Yersal *et al.*, 2016). Ces patients présentent des symptômes tels que des douleurs abdominales, des diarrhées ou des ballonnements (Taşova *et al.*, 2000). Les STs communément retrouvés sont le ST1 et le ST3. Par ailleurs, des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que *Blastocystis* pourrait favoriser la prolifération des cellules tumorales et donc la carcinogénèse (Chan *et al.*, 2012; Chandramathi *et al.*, 2010a; Kumarasamy *et al.*, 2013, 2017).

## 7. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de *Blastocystis* spp. est largement débattu du fait de la présence de nombreux porteurs asymptomatiques. Néanmoins, l'accumulation de données épidémiologiques, l'analyse des données génomiques ainsi que des études menées *in vitro* et/ou *in vivo* suggèrent une réelle pathogénicité du parasite.

### 7.1. Facteurs de virulence

Le séquençage des génomes de différents STs de *Blastocystis* (ST7, ST4 et ST1) a permis d'identifier plusieurs gènes issus de transferts horizontaux acquis de bactéries mais également de l'hôte et qui pourraient être impliqués dans la pathogénicité (Denoeud *et al.*, 2011; Eme *et al.*, 2017). Un gène codant pour une  $\beta$ 1,3galactosyltransférase issue de l'hôte serait un mécanisme d'échappement du parasite (Eme *et al.*, 2017). En effet, cette enzyme est responsable de la synthèse d'antigènes du soi exprimés par divers types cellulaires dont les entérocytes (Isshiki *et al.*, 1999). Les auteurs supposent alors que *Blastocystis* pourrait mimer la surface des cellules de l'hôte et donc échapper au système immunitaire. Dans la même optique, l'acquisition d'une cholestérol- $\alpha$ -glucosyltransférase d'origine bactérienne a été décrite (Eme *et al.*, 2017). Le cholestérol contenu dans les membranes bactériennes stimule la phagocytose par les

macrophages. Ainsi, la glycosylation du cholestérol permet alors l'échappement de *Helicobacter pylori* (Wunder *et al.*, 2006). Denoeud *et al.*, ont décrit un gène codant pour une polykétide synthase (PKS) d'origine bactérienne dans le génome de *Blastocystis* ST7 qui pourrait contribuer à l'induction d'une dysbiose intestinale (discuté dans le paragraphe suivant) (Denoeud *et al.*, 2011). De manière générale, ces transferts ont probablement permis aux parasites d'évoluer et de s'adapter à leur environnement.

Par ailleurs, l'analyse *in silico* du génome du ST7 a permis d'identifier différentes protéines potentiellement impliquées dans la virulence du parasite (Denoeud *et al.*, 2011). Des hydrolases (fucosidases, hexosaminidases et  $\beta$ -galactosidases) ont été mises en évidence dans le sécrétome prédictif du ST7. Le parasite utilise probablement ces hydrolases pour dégrader les glycoprotéines constituant le mucus à des fins nutritionnelles. Le mucus peut également être dégradé par des protéases à cystéine (Steck *et al.*, 2012). En effet, l'analyse du génome du ST7 a mis en évidence 68 gènes codant des protéases avec une majorité de protéases à cystéine. Une vingtaine de protéases sont prédites comme étant sécrétées, dont 20 protéases à cystéine, 1 protéase à sérine et 1 protéase à aspartate (Denoeud *et al.*, 2011). Ces différentes protéines pourraient participer à la dégradation du mucus, l'augmentation de la perméabilité intestinale, la mise en place d'une réponse inflammatoire mais aussi la modulation du message nociceptif (Steck *et al.*, 2012). Il existe de nombreuses évidences quant à l'implication des protéases à sérine dans l'activation des FAP coliques conduisant à de l'hypersensibilité viscérale (voir Chapitre 2). Par ailleurs, des gènes codant des inhibiteurs de protéases ont été également identifiés dans le génome du ST7, ces molécules pouvant favoriser un microenvironnement adéquat pour la survie du parasite. On retrouve également des gènes codant une PKS, une mégasynthase susceptible de produire des métabolites secondaires ayant des activités antibactériennes ou encore immuno-modulatrices, ainsi que pour des NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthase) qui synthétisent des peptides non ribosomiaux aux propriétés parfois antibactériennes (Schwarzer et Marahiel, 2001). La production d'antibactériens par le parasite pourrait lui permettre de créer un microenvironnement favorable à son implantation, mais aussi à terme, provoquer une dysbiose intestinale. Enfin, le ST7 possède des gènes codant pour des protéines constitutives de canaux ou de pompes membranaires (transporteurs ABC), qui pourraient contribuer à la multi-résistance aux drogues et conférer au parasite une résistance aux différents traitements utilisés. Ces différents facteurs de virulence ne sont pas spécifiques du ST7. En effet, certains gènes orthologues ont été retrouvés dans le génome des sous-types ST4 et ST1 (Gentekaki *et al.*, 2017; Wawrzyniak *et al.*, 2015). Il existe néanmoins une diversité génétique

entre les différents STs pouvant expliquer la présence éventuelle de ST plus ou moins virulents (Gentekaki *et al.*, 2017).

L'analyse du surnageant de cultures axéniques de ST7 a confirmé la présence de protéases sécrétées par *Blastocystis*. L'analyse en spectrométrie de masse des surnageants de culture a en effet permis d'identifier deux protéases à cystéines: une légumaine et une cathepsine B (Wawrzyniak *et al.*, 2012). De plus, l'ajout de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF), un inhibiteur spécifique des protéases à sérine, dans le surnageant de culture diminue l'activité protéasique témoignant d'une activité protéase à sérine. De plus, des expériences menées au laboratoire ont montré la production d'H<sub>2</sub>S, de manière dose dépendante, en présence de concentrations croissantes de L-cystéine. Comme décrit précédemment dans le Chapitre 2, l'H<sub>2</sub>S peut participer à la mise en place d'une HSVC.

## 7.2. Etudes *in vitro*

Les modèles cellulaires permettent d'étudier les mécanismes physiopathologiques de l'infection par *Blastocystis* en l'absence d'un modèle animal reproductible. Plusieurs études *in vitro* ont été menées afin d'évaluer l'influence du parasite et/ou de ses métabolites sur des cellules épithéliales. Cependant, il faut noter que ces modèles cellulaires sont empiriques du fait de la nature anaérobie de *Blastocystis* et de l'absence de culture axénique pour de nombreux sous-types notamment le ST3. De plus, l'utilisation des cultures axéniques contenant une majorité de formes vacuolaires ne reflète pas le polymorphisme existant et donc l'impact des différentes formes observées *in vivo*.

### 7.2.1. Perméabilité intestinale et apoptose

L'un des premiers effets observés a été la capacité de *Blastocystis* à induire l'apoptose des cellules épithéliales intestinales. Puthia *et al.*, ont en effet montré que des formes « vivantes » ou lysées de *Blastocystis* ST4 WR1 (isolat de rat) induisent l'apoptose de cellules épithéliales intestinales de rats (IEC-6) (Puthia *et al.*, 2006). Cet effet pro-apoptotique, indépendant du contact parasitaire, a également été décrit suite à la co-incubation de cellules épithéliales coliques humaines (Caco-2) avec un lysat parasitaire de ST7-B (isolat provenant d'un patient symptomatique) (Wu *et al.*, 2014a). Néanmoins, l'apoptose n'est pas observée après incubation avec un lysat de ST4 WR1 (isolat de rat) suggérant une spécificité d'hôtes. L'apoptose a été

également décrite comme un mécanisme d'échappement au système immunitaire dans un contexte pro-tumoral (Chandramathi *et al.*, 2010a). En effet, au contact d'antigènes solubles de *Blastocystis*, l'expression de gènes pro-apoptotiques (P53 et Cathepsine B) est augmentée dans les cellules mononucléées du sang suggérant une adaptation du parasite afin de favoriser sa survie et sa propagation chez l'Homme.

Le mécanisme d'apoptose est souvent associé à une augmentation de la perméabilité intestinale. Il a été démontré que la perméabilité intestinale de cellules IEC-6 était augmentée *in vitro* lorsque les cellules étaient mises en contact d'un lysat parasitaire (Mirza *et al.*, 2012; Puthia *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2014a). La co-incubation des cellules épithéliales IEC-6 avec des lysats de ST4 WR1 favorise les réarrangements des filaments d'actine diminuant ainsi la résistance trans-épithéliale et conduisant à l'augmentation de la perméabilité intestinale (Puthia *et al.*, 2006). De même, la perméabilité intestinale est augmentée lorsque des cellules Caco-2 sont co-incubées avec des lysats de ST7-B (Wu *et al.*, 2014a). Le ST7-B est capable de modifier la distribution de ZO-1, impliquée dans la formation des jonctions serrées, de manière caspase dépendante. Plus récemment, Wu *et al.*, (Wu *et al.*, 2014b) ont souligné l'importance de l'adhésion parasitaire, dont l'efficacité est variable selon les STs. L'adhésion se fait préférentiellement au niveau des jonctions serrées et peut être inhibée par l'ajout de galactose dans le milieu de culture, suggérant un rôle des composés glycosylés à la surface de l'épithélium intestinal. L'adhésion du parasite à l'épithélium induit la réorganisation des protéines des jonctions serrées notamment l'occludine et la protéine ZO-1 (Wu *et al.*, 2014a). Les protéases à cystéine produites par le ST7 telles que la cathepsine B et la légumaine sont à l'origine du réarrangement des jonctions serrées et sont capables d'induire le réarrangement des filaments d'actine de la cellule *via* la phosphorylation des myosines par des Rho kinases (Mirza *et al.*, 2012; Nourrisson *et al.*, 2016).

### 7.2.2. Effets immuno-modulateurs

*Blastocystis* possède également des propriétés immuno-modulatrices. Des travaux expérimentaux ont montré que les protéases à cystéine issues de lysats parasitaires ou de surnageants de culture du parasite sont capables de cliver les IgA sécrétées (Puthia *et al.*, 2005). Ces mêmes protéases à cystéine induisent également la production d'IL-8 *via* la voie NF- $\kappa$ B par les cellules épithéliales (Puthia *et al.*, 2008). La production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  a été également rapportée suite à l'exposition de ces cellules à des lysats de ST4 et de ST7.

L'activation de la voie MAP kinase par les protéases à sérine produites par le parasite serait à l'origine de cet effet pro-inflammatoire (Lim *et al.*, 2014). En 2001, Long *et al.*, ont montré que le ST1 (isolat Nandll) induisait la production tardive d'IL-8 et de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) par les cellules épithéliales humaines T84 et HT29 (Long *et al.*, 2001). La présence du parasite a été associée à une réduction de la production de cytokines par les cellules exposées à du LPS d'*E. coli* (Long *et al.*, 2001). Les auteurs concluent donc qu'il s'agirait d'un mécanisme permettant au parasite de moduler la réponse immunitaire de l'hôte le temps de son implantation. Plus récemment, il a été montré que le ST7 et le ST4 mis en co-culture avec une lignée de monocytes (THP1-blue) bloquent la voie NF- $\kappa$ B médiée par le LPS (déterminée par les taux de phosphatase alcaline exprimée sous le contrôle du promoteur inducible NF- $\kappa$ B) (Teo *et al.*, 2014). Par ailleurs, les lysats du parasite augmenteraient les effets du LPS (production de cytokines). Cette même étude, suggère aussi que *Blastocystis* serait capable d'atténuer l'effet du zymosan, agoniste du TLR2 (Teo *et al.*, 2014). Des investigations supplémentaires sur la voie NF- $\kappa$ B et notamment la régulation de l'expression de cytokines sont nécessaires pour mieux comprendre l'effet du parasite.

### 7.2.3. Prolifération cellulaire

Des études cliniques ont mis en avant une association entre les patients atteints de cancer et l'infection par *Blastocystis* spp. De plus, des études *in vitro* ont montré que des lysats parasitaires de différents STs avaient la capacité de stimuler la croissance des cellules tumorales HCT116 (Chan *et al.*, 2012; Chandramathi *et al.*, 2010a; Kumarasamy *et al.*, 2013). Cette prolifération de cellules tumorales semble néanmoins être plus importante en présence de lysats parasitaires de ST3 (Kumarasamy *et al.*, 2013). De plus, cette prolifération cellulaire est associée à la production de cytokines Th2 (Chan *et al.*, 2012; Chandramathi *et al.*, 2010a). Cependant, les auteurs associent l'IL-6 le TNF- $\alpha$  une réponse Th2 alors que les cytokines sécrétées majoritairement par les lymphocytes Th2 sont l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Ainsi la croissance tumorale est plutôt associée à une réponse inflammatoire qu'une réelle réponse de type Th2.

### 7.3. Etudes *in vivo*

#### 7.3.1. Modèles d'infection

A ce jour une quarantaine d'études *in vivo* ont porté sur la mise en place de modèles d'infection par *Blastocystis*. Il existe une forte disparité entre ces études concernant l'espèce animale utilisée, le mode d'infection, le ST et la forme du parasite utilisés, la quantité de l'inoculum et la durée d'infection (Ajampur et Tan, 2016). Le modèle animal ne semble donc pas standardisé.

De nombreuses espèces animales ont été utilisées comme modèle d'infection par *Blastocystis* : rats (**Tableau 2**), souris (**Tableau 3**), poulets, cochons d'Inde, gerbilles et mini-porcs. Au sein même d'une espèce les fonds génétiques divergent comme pour la souris avec l'utilisation de souris BALB/c, C57BL/6 ou Swiss. L'espèce la plus communément utilisée dans les différentes études est le rat Wistar ce qui pose la question de savoir si les autres espèces sont réellement susceptibles à l'infection. Les infections expérimentales sont en général menées chez des animaux très jeunes entre 3 et 4 semaines. Moe *et al.*, ont montré que des souris âgées de plus de 8 semaines ne sont pas permissives à l'implantation de *Blastocystis* (Moe *et al.*, 1997). Cependant, une étude récente a montré que l'âge n'était pas un facteur de susceptibilité puisque des rats adultes âgés de 12 à 20 semaines étaient également susceptibles à l'infection (Růžková *et al.*, 2018).

Les STs et les formes du parasite utilisées varient en fonction de leur provenance (selles, cultures *in vitro*...). Les cultures axéniques sont composées majoritairement de formes vacuolaires. L'administration orale ainsi que les injections intra-caecale de ces formes vacuolaires semblent induire une infection chez l'animal (Moe *et al.*, 1997; Pavanelli *et al.*, 2015; Santos et Rivera, 2009). Cependant, différentes études ont montré que le kyste était la seule forme infectieuse (Suresh *et al.*, 1993; Yoshikawa *et al.*, 2004). Des protocoles d'enkystement *in vitro* à partir des cultures axéniques ont été décrits, pourtant ceux-ci n'ont jamais été utilisés par la suite (Suresh *et al.*, 1993). L'utilisation de kystes issus des selles de patients semblent être la seule méthode de choix pour infecter les animaux de manière reproductible. Différents protocoles de purification des kystes ont été décrits à l'aide de gradient de ficoll, de sucrose ou de percoll (Chandramathi *et al.*, 2010b; Růžková *et al.*, 2018; Yoshikawa *et al.*, 2004). Cependant, aucune donnée concernant le nombre de bactéries associées aux kystes n'est disponible posant la question de savoir si les effets biologiques constatés chez les animaux ne sont pas dus à la

flore bactérienne apportée plutôt qu'au parasite lui-même. Par ailleurs, la concentration de parasite utilisée est variable en fonction des études, 10 kystes étant suffisant pour induire une infection chez le rat (Yoshikawa *et al.*, 2004). Cependant, les infections expérimentales sont la plupart du temps réalisées avec  $10^5$  parasites (voir Tableau 2 et 3).

Lorsque les animaux sont infectés, des parasites sont retrouvés tout le long du tractus intestinal. Les segments les plus touchés sont le cæcum avec la présence majoritaire de formes vacuolaires et le colon avec majoritairement des kystes. Certaines études ont aussi mis en évidence des formes vacuolaires dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Fayer *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2005). La localisation préférentielle de *Blastocystis* est généralement dans la lumière intestinale ou aux abords de l'épithélium, suggérant la dégradation des couches de mucus (Fayer *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014a). Iguchi *et al.*, ont montré une augmentation des cellules caliciformes contenant de la mucine neutre chez les rats expérimentalement infectés (Iguchi *et al.*, 2009). La couche de mucus semble jouer un rôle important dans la résistance des souris à l'infection. L'utilisation de Dextran Sodium Sulfate (DSS) permet d'altérer la couche de mucus et d'induire des dommages de l'épithélium intestinal conduisant à l'entrée de micro-organismes au niveau de la muqueuse et donc d'induire une inflammation. L'utilisation de DSS chez la souris permet une colonisation du tractus intestinal par le ST7 (Ajjampur *et al.*, 2016). D'autres études sont donc nécessaires pour préciser l'interaction entre ce parasite et le mucus, et mieux comprendre comment ce parasite peut traverser la couche de mucus pour atteindre la surface des cellules épithéliales. Quelques cas d'invasion de la *lamina propria* et de la couche musculaire ont été répertoriés suite à l'observation de coupes histologiques. Cependant, des méthodes immunologiques sont nécessaires pour identifier des formes invasives du parasite et affirmer qu'il s'agit bien de *Blastocystis*.

### 7.3.2. Effets biologiques

L'infection chez l'animal par le ST1 et le ST3 a révélé des infiltrats de cellules inflammatoires notamment des lymphocytes et des éosinophiles au niveau de la muqueuse, de la sous-muqueuse ainsi que des œdèmes (Abdel-Hafeez *et al.*, 2016; Elwakil et Hewedi, 2010; Li *et al.*, 2013; Moe *et al.*, 1997; Pavanelli *et al.*, 2015). Ces résultats n'ont pas été observés chez des animaux infectés avec le ST4 bien qu'une augmentation de l'expression des gènes codant des cytokines pro-inflammatoires au niveau intestinal (Interféron  $\gamma$ , IL-12 et TNF- $\alpha$  a été décrite (Iguchi *et al.*, 2009). Par ailleurs, des taux significativement plus élevés d'IL-6 et d'IL-8



sériques ont été mesurés chez les rats infectés (Chandramathi *et al.*, 2010). Cette production de cytokines a été associée à une augmentation de la quantité de hyaluronidase et de molécules oxydantes dans les urines et le sérum des animaux (Chandramathi *et al.*, 2010b; Chandramathi *et al.*, 2010). Des études sérologiques chez des animaux infectés ont révélé des taux élevés d'IgM, d'IgG et d'IgA intestinales (Santos et Rivera, 2009; Wang *et al.*, 2014b). Par ailleurs, la sévérité de l'inflammation a été associée à la charge parasitaire mais également à certains STs. Hussein *et al.*, ont mis en évidence que les ST1, ST3 et ST4 isolés de patients symptomatiques induisaient une inflammation modérée à sévère chez l'animal. En revanche, les ST2, ST3 et ST4 isolés de patients asymptomatiques ne provoquaient pas ou très peu d'inflammation chez le rat (Hussein *et al.*, 2008). Dans cette même étude, l'augmentation de la perméabilité intestinale n'a été associée qu'aux ST isolés de patients symptomatiques. Cependant, dans une autre étude, aucune modification de l'expression des protéines des jonctions serrées (occludine et ZO-2) n'a été constatée (Iguchi *et al.*, 2009).

Une seule étude fait part de l'impact du stress a été évalué suite à une infection par *Blastocystis* chez le rat. Le stress a été induit par la secousse des cages à 90rpm pendant 1h durant 30 jours. L'utilisation de ce modèle de stress chez le rat (*Belly Dancer Shaker*) a permis de mettre en évidence une augmentation de la sécrétion de kystes mais également une augmentation des taux d'IgE, de l'oxydation des protéines (AOPP- produits de l'oxydation avancée des protéines) et de la peroxydation des lipides (LHP- hydroperoxydes lipidiques) chez les animaux stressés et infectés par *Blastocystis* (Chandramathi *et al.*, 2014).

Enfin de récents travaux ont montré que dans un modèle de cancer induit par l'azoxyméthane, le ST3 favorisait le développement d'une hyperplasie et la production de molécules oxydantes dans les urines suggérant une contribution dans le phénomène de carcinogénèse (Kumarasamy *et al.*, 2017)

## 8. Traitements

De nombreuses molécules ont été évaluées dans le traitement de la blastocystose mais aucun consensus n'est défini quant à leur utilisation (**Figure 12**) (Coyle *et al.*, 2012; Stensvold *et al.*, 2010). Aucun traitement n'est préconisé dans le cas de portage asymptomatique. A l'inverse, les patients symptomatiques sans autre étiologie identifiée doivent être traités.

Le métronidazole (Flagyl®) est un antibiotique classiquement utilisé lors d'infection par des bactéries anaérobies ou des parasites (amibes, protozoaires flagellés...). Cette molécule utilisée en première intention a montré une certaine efficacité contre *Blastocystis* spp (Coyle *et al.*, 2012; Toro Monjaraz *et al.*, 2018). Néanmoins, son efficacité reste limitée par l'existence de certains isolats résistants ou présentant des niveaux de sensibilités variables à cet antibiotique (Haresh *et al.*, 1999; Mirza *et al.*, 2011).

L'utilisation de triméthoprimé/sulfaméthoxazole (Bactrim®) en seconde intention est recommandée en cas d'intolérance ou pour les patients en échec thérapeutique (Coyle *et al.*, 2012). Néanmoins, cette molécule ne permet pas de réduire les symptômes associés à l'infection (Toro Monjaraz *et al.*, 2018).

Le nitazoxanide (Alinia®) ainsi que d'autres molécules telles que l'iodoquinol, le tinidazole, le kétoconazole, la paromomycine ou le secnidazole ont montré une efficacité variable dans le traitement de l'infection (Coyle *et al.*, 2012; Stensvold *et al.*, 2010; Toro Monjaraz *et al.*, 2018).

Toutes ces molécules étant majoritairement des antibiotiques, leur impact sur la flore intestinale doit être pris en compte, notamment en raison du rôle central du microbiote dans les pathologies chroniques intestinales. Le développement de traitements plus spécifiques semble donc nécessaire.

## Synthèse

*Blastocystis* est un protozoaire intestinal, appartenant aux Straménopiles, retrouvé chez l'Homme et chez de nombreuses espèces animales. Sa prévalence est mondiale et varie en fonction des conditions d'hygiène. Ce micro-organisme est classé en 17 sous-types (ST) basés sur la séquence du gène codant l'ARNr 18S et 10 STs sont retrouvés chez l'Homme (ST1-ST9 et ST12). Son rôle en santé humaine est très controversé malgré de récentes études rapportant une plus forte prévalence de ce parasite chez des patients atteints de SII, de cancers, d'urticaire ou encore des patients immunodéprimés. L'accumulation de données génomiques et expérimentales suggère une réelle contribution de *Blastocystis* dans ces différentes pathologies notamment le SII (Figure 13). Néanmoins, l'absence d'un modèle animal standardisé ne permet pas de confirmer ces données et donc d'étudier les interactions entre le parasite et son hôte.

---

## Chapitre 4: Objectifs

---

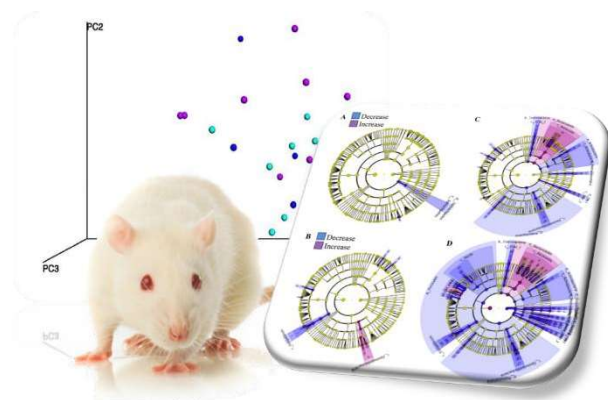
Le SII est une pathologie multifactorielle touchant environ 11% de la population mondiale et dont l'impact économique est non négligeable. La physiopathologie est complexe, ce qui fait que la prise en charge des patients est actuellement limitée. De manière intéressante, de nombreuses études épidémiologiques indiquent une association entre le SII et la prévalence de *Blastocystis*. L'absence d'un modèle animal fiable et reproductible ne permet pas d'établir de lien entre cette pathologie et l'infection parasitaire ce qui rend le rôle de ce parasite en santé humaine très controversé.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été de mettre en place un modèle animal d'infection par *Blastocystis*. De nombreuses expérimentations ont été réalisées chez le rat mais également chez la souris à l'aide de différents STs et de différentes formes parasitaires isolés de selles humaines ou produits en culture *in vitro*. De manière intéressante, nous avons réussi à établir un modèle reproductible d'infection chronique par *Blastocystis* chez le rat de laboratoire à l'aide de kystes purifiés à partir de selles humaines.

Le second objectif de ma thèse a été de déterminer si l'infection par *Blastocystis* peut conduire au développement d'une HSVC associée à une dysbiose intestinale dans le but de développer un nouveau modèle murin de SII d'origine infectieuse. Nous avons mis en évidence que *Blastocystis* ST4 induisait une HSVC sans origine inflammatoire chez les rats infectés. De plus, les animaux développaient un comportement type anxio-dépressif corrélé à l'HSVC. La dysbiose intestinale associée à l'infection se caractérisait par des modifications de la composition du microbiote intestinal mais également des altérations du métabolome. Nous avons en effet mis en évidence une diminution des concentrations d'AGCC et une augmentation de l'activité de protéases à sérine dans les fèces des animaux infectés pouvant expliquer l'HSVC.

Ces données suggèrent qu'une infection gastro-intestinale par *Blastocystis* serait associée à la mise en place d'une HSVC et d'une dysbiose intestinale. Ainsi, ce nouveau modèle d'infection pourrait être un bon modèle de SII d'origine infectieuse et pourrait donc contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies chroniques de l'intestin chez certains individus

# Partie B : Données expérimentales



---

## Article 1: Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp.

---

*Blastocystis* est un protozoaire intestinal retrouvé dans le tractus intestinal d'un grand nombre d'espèces animales ainsi que chez l'Homme (Tan, 2008). Quatre stades morphologiquement différents ont été caractérisés : la forme amiboïde, la forme granulaire, la forme vacuolaire et le kyste. Les formes vacuolaires et les kystes sont fréquemment retrouvés dans les selles de patients et ce dernier stade est considéré comme la forme infectieuse du parasite (Stenzel et Borcham, 1996; Tan, 2008; Wawrzyniak *et al.*, 2013). Sur la base du gène codant l'ARN ribosomique de la petite sous-unité (ARNr 18S), *Blastocystis* a été classé en 17 sous-types (ST) dont 10 ont été retrouvés chez l'Homme (ST1 à ST9 et ST12) (Alfellani *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2016; Stensvold et Clark, 2016). A noter que le ST le plus fréquent chez l'Homme est le ST3 suivi par le ST1, le ST2 et le ST4 (Stensvold *et al.*, 2009a). Cependant, cette répartition des STs varie en fonction de certaines régions du monde et de manière intéressante le ST4 est fortement répandu en Europe (Domínguez-Márquez *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2011; Poirier *et al.*, 2011).

L'infection par *Blastocystis* est aussi bien retrouvée chez les patients immunodéprimés que les patients immunocompétents. Par ailleurs, de récentes études épidémiologiques ont décrit une forte prévalence de ce parasite dans certains contextes pathologiques tels que le cancer colorectal ou le SII suggérant un lien de cause à effet entre la présence de ce parasite et le développement de ces pathologies (Mohamed *et al.*, 2017; Nourrisson *et al.*, 2014; Padukone *et al.*, 2017; Rostami *et al.*, 2017). Néanmoins, l'implication de *Blastocystis* en santé humaine est encore largement débattue. Afin de palier à cette controverse, des modèles animaux ont été utilisés afin de valider les postulats de Koch mais peu d'études *in vivo* ont été publiées en raison des difficultés rencontrées dans l'établissement et la reproductibilité de ces modèles (Ajjampur et Tan, 2016). Comme vu précédemment dans le chapitre 3, la forte disparité des modèles d'infection expérimentales par *Blastocystis*, tant par l'espèce animale que les différentes formes et/ou STs utilisés, montre bien l'absence d'un modèle standardisé. Cette hétérogénéité confirme la nécessité d'établir un modèle fiable et reproductible pour enfin comprendre les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection.

Dans cette étude nous avons évalué le pouvoir infectieux de différents STs et différentes formes du parasite (formes vacuolaires ou kystes), isolés de culture axénique ou purifiés à partir de selles de patients et d'animaux, chez des animaux de laboratoire (rats et souris). De manière intéressante, nous avons réussi à établir un modèle reproductible d'infection chronique par *Blastocystis* chez le rat de laboratoire à l'aide de kystes purifiés à partir de selles humaines.

# Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp.

Manon Defaye<sup>1,2,¶</sup>, Céline Nourrisson<sup>1,3,¶</sup>, Elodie Baudu<sup>2,4</sup>, Ivan Warwzyniak<sup>1</sup>, Virginie  
Bonnin<sup>4</sup>, Mathilde Bonnet<sup>4</sup>, Nicolas Barnich<sup>4</sup>, Denis Ardid<sup>2</sup>, Frédéric Delbac<sup>1</sup>,  
Frédéric Antonio Carvalho<sup>2,&,\*</sup> and Philippe Poirier<sup>1,3,&,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, 3iHP, CNRS, Laboratoire Micro-organismes :  
Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, 3iHP, Inserm U1107, NeuroDol, Clermont-Ferrand,  
France

<sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, CHU, 3iHP, CNRS, Laboratoire Micro-organismes :  
Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> Université Clermont Auvergne, 3iHP, Inserm U1071, USC INRA 2018, Microbes,  
Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, Clermont-Ferrand, France

\* Corresponding Authors: [ppoirier@chu-clermontferrand.fr](mailto:ppoirier@chu-clermontferrand.fr) (PP)

[frederic.carvalho@uca.fr](mailto:frederic.carvalho@uca.fr) ; FC)

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work



## Abstract

Although *Blastocystis* spp. infect probably more than 1 billion people worldwide, their clinical significance is still controversial and their pathophysiology remains poorly understood. In this study, we describe a protocol for an efficient and reproducible model of chronic infection in rats, laying the groundwork for future work to evaluate the pathogenic potential of this parasite. In our experimental conditions, we were unable to infect rats using vacuolar forms of an axenically cultivated ST4 isolate, but we successfully established chronic infections of 4 week-old rats after oral administration of both ST3 and ST4 purified cysts isolated from human stool samples. The infection protocol was also applied to 4 week-old C57BL/9, BALB/C and C3H mice, but any mouse was found to be infected by *Blastocystis*. Minimal cyst inoculum required for rat infection was higher with ST3 ( $10^5$ ) than with ST4 ( $10^2$ ). These results were confirmed by co-housing experiments highlighting a higher contagious potential of ST4 in rats compared to ST3. Finally, experiments mimicking fecal microbiota transfer from infected to healthy animals showed that *Blastocystis* spp. could easily infect a new host, even though its intestinal microbiota is not disturbed. In conclusion, our results provide a well-documented and robust rat model of *Blastocystis* chronic infection, reproducing “natural” infection. This model will be of great interest to study host parasite interactions and to better evaluate clinical significance of *Blastocystis*.

## Introduction

*Blastocystis* spp. are anaerobic enteric protist found in the intestinal tract of a wide range of animals, and are probably the most prevalent human parasites (1). Four morphological stages of *Blastocystis* spp. have been described including amoeboid, granular, vacuolar and cystic stages. Both vacuolar and cystic forms are commonly found in human fecal samples and cyst is considered to be the infectious stage (1–3). *Blastocystis* spp. have been classified into 17 subtypes (ST) based on nuclear small subunit (SSU) ribosomal RNA-encoding gene, the ST1 to ST9 and ST12 being recovered from human (4–7). ST3 is the most frequent subtype in human, followed by ST1, ST2 and ST4 (5). However, this distribution depends on geographic areas, and a higher prevalence of ST4 was reported from the north of Europe (7–9).

*Blastocystis* spp. infection occurs in both immunocompetent and immunocompromised hosts and recent studies highlighted higher prevalence of these parasites in patients with Irritable Bowel Syndrome (IBS) and colorectal cancer (10–13). However, the involvement of *Blastocystis* spp. in human diseases is highly debated and well-designed epidemiological studies still need to be performed. Animal experimental models for *Blastocystis* infection have been purposed for proving Koch's postulates, but few animal-based studies have been published so far, suggesting difficulties in the establishment and reproducibility of these models (14). To date various animal models were used for *Blastocystis* infection as rodents (rats or mice), guinea pigs or chickens. Moreover, studies have shown that both vacuolar and cystic stages of different STs can efficiently infect animals (14). The heterogeneity of infection

methods with various animal models and/or different STs inoculation confirm that the establishment of a standardized model is necessary.

In this study, we evaluated several methods to inoculate *Blastocystis* spp. into laboratory animals (mice and rats) using different parasitic stages (vacuolar and cystic forms) isolated from *in vitro* cultures or from human or animal feces. Interestingly, we succeeded in the development of a reproducible model of chronic infection in juvenile and adult Wistar rats using purified cysts isolated from human stools.

## Materials and methods

### Animals.

All animals were housed in animal biosafety level 2 (21–22°C, 12:12 h light-dark cycle) with access to food and water *ad libitum*. Three- and ten-week-old specific-pathogen-free (SPF) Wistar male rats and three-week-old SPF C57BL/9, BALB/C and C3H mice were purchased from Charles River Lab (Saint Germain Nuelles, France). All experiments were performed according to the ethical guidelines set out in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with approval of the “Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale Auvergne” (C2E2A), the local ethics committee (Reference number: EU0116-3003). After experimental infections with *Blastocystis*, fecal samples were collected every week until sacrifice.

### ***Blastocystis* ST4 axenic cultures.**

*Blastocystis* ST4 WR1 strain isolated from Wistar rats and axenized by Chen *et al.*, (15) was cultured anaerobically in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with 10% horse serum (PAA, Pasching, Austria) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C.

Vacuolar forms were collected from 48h-old cultures by centrifugation at 1000 g for 10 min and suspended in sterile phosphate buffered saline (PBS) to reach a concentration of  $10^7$  parasites per milliliter and were used for experimental infections.

## **Oral administration of vacuolar forms isolated from axenic *Blastocystis* ST4 strain.**

In a first experiment, four-week-old Wistar male rats were orally inoculated with  $10^7$  ST4 vacuolar forms per rat from *in vitro* axenic culture (n=14). Eight rats were used to evaluate kinetic of ST4 route through the gastrointestinal tract and six rats were kept to monitor the progression of infection over time. To reduce gastric acidity, rats received 3 oral administrations every 2 hours of cimetidine (50 mg/kg, Mylan, Canonsburg, PA, USA) (n=4) or 0.2 M sodium bicarbonate (Cooper, Melun, France) (n=4) before oral inoculation with  $10^7$  vacuolar forms of ST4 in a second experiment. Similarly as before, four rats were used to evaluate kinetic of ST4 route through the gastrointestinal tract and four rats were kept to monitor the progression of infection over time.

## **Kinetic of ST4 route through the gastrointestinal tract of experimentally-infected rats.**

After oral administration of ST4, rats were euthanized at 3 (n=2), 6 (n=2), 12 (n=2) or 24 h (n=2) post-inoculation (PI). Stomach content was collected at 3 h PI, stomach and duodenum contents at 6 h PI, ileum and caecum contents at 12 h PI, and caecum, proximal and distal colon contents at 24 h PI.

For the experiments with animals pretreated with cimetidine or sodium bicarbonate, euthanasia of rats was done at 3 or 6 h (n=2 for each time and condition). Stomach contents were collected at 3 h PI and caecum contents at 6 h PI.

## **Intra-caecal inoculation of vacuolar forms isolated from axenic *Blastocystis* ST4.**

Four-week-old Wistar male rats were intra-caecally inoculated with  $10^7$  ST4 vacuolar forms per rat from axenic culture (n=6). Briefly, after 24 h of fasting, rats were anesthetized (Ketamine 75 mg/kg + Xylazine 10 mg/kg), followed by an abdomen incision, caecum externalization and injection of  $10^7$  ST4 vacuolar forms. Then, caecum was repositioned and abdomen sutured.

## ***Blastocystis* isolates collected from human stools.**

Four asymptomatic human carriers of *Blastocystis* ST2, ST3, ST4 and ST7 were identified at the medical laboratory of Parasitology of the Clermont-Ferrand teaching hospital (France). Both *Blastocystis* cysts and vacuolar forms were observed in stools for patients with ST2, ST3 and ST4, whereas only vacuolar forms were observed for the ST7 carrier. Fresh stools were collected for animal infections (approved by the research ethics committees of the Clermont-Ferrand Hospital, "Comité de Protection des Personnes Sud-Est 6", France, agreement ref: 2014/CE29). Subtyping was performed by SSU rDNA sequencing as previously described (9,16). Sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **Purification of cysts isolated from human stools.**

Cysts were purified from human stools of ST2-, ST3- or ST4-infected patients (one patient for each subtype) by an optimized method (**Figure 14**) adapted from

Yoshikawa's protocol (17). Almost 50 g of fresh stools were suspended in distilled water and larger debris were removed by filtration (funnel with filter disc 1mm, Theradiag, Marne La Vallee, France). The fecal suspension was washed twice in distilled water by centrifugation at 1700 g for 10 min. The supernatant was discarded and pellet was suspended in 40 ml of sucrose solution ( $d = 1.20$ ) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and was divided into 15 ml tubes. Then, 0.5 ml of distilled water was added in each tube followed by a centrifugation at 1700 g for 10 min. The interface between sucrose and distilled water was collected and suspended in distilled water. Two washes in distilled water were performed by centrifugation at 1700 g for 10 min. The pellet was suspended in 0.5 ml of distilled water and mixed with 7 ml Percoll solution ( $d = 1.13$ ) (MP Biomedicals, Illkirch, France). Then, 6 ml of distilled water were added, followed by a centrifugation at 1200 g for 10 min. The interface between distilled water and Percoll solution was collected, adjusted to 15 ml with distilled water and centrifuged at 1700 g for 10 minutes. This step using Percoll gradients was performed twice. Pellets containing purified cysts were suspended in 0.5 ml of an antibiotic cocktail containing 0.01 g/L Vancomycin (Sandoz, Levallois-Perret, France), 0.1 g/L Amoxicillin-clavulanic acid (Sandoz, Levallois-Perret, France) and 0.1 g/L Cefotaxim (SteriMax, Oakville, ON, Canada) diluted in sterile PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated for 6 h at 4°C. Cysts were washed twice in sterile PBS by centrifugation at 300 g for 5 min and finally suspended in sterile PBS. Ten microliters of the suspension were plated on LB media and incubated at 37°C for 24 h in order to quantify the number of Colony Forming Units (CFU).

Cysts were counted in Malassez chamber and suspension was diluted in sterile PBS to obtain concentrations of  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  or  $10^5$  cysts per milliliter.

### **Oral administration of purified cysts isolated from human stools.**

Wistar male rats (four or twelve-week-old) were orally inoculated with  $10^2$ /rat to  $10^5$ /rat ST2, ST3 or ST4 purified cysts isolated from human stools (n=5 for each condition). *Blastocystis* isolated from rat feces after infection were subtyped by sequencing the SSU rRNA encoding gene as described above. For mice infections,  $10^5$  ST4 purified cysts per animal were orally inoculated to four-week-old C57BL/6 (n=3), BALB/C (n=3) or C3H mice (n=3).

### **Co-housing experiments.**

Four-week-old Wistar male rats were orally inoculated with  $10^5$  ST3 (n=2) or ST4 (n=2) purified cysts per animal, as described above. Four-weeks PI, these animals were co-housed for 6 weeks with eight-week-old non-infected rats (n=4 per ST).

### **Oral administration of rat feces containing *Blastocystis* cysts.**

Fresh feces from experimentally-infected rats, containing ST3 or ST4 cysts, were collected. Almost 300 mg of feces samples were pooled and suspended in 3 ml of sterile PBS. Then, eight-week-old rats (n=3, for each ST) were orally inoculated with  $10^5$  cysts.



## **Fecal microbiota transplantation (FMT) using *Blastocystis*-positive human stools.**

Fresh stools from infected humans, containing ST2 or ST3 or ST4 cysts, or ST7 vacuolar forms, were collected. Almost 30 g of each fecal samples were suspended in 90 ml of sterile PBS. Moreover, almost 30 g of ST4 fecal sample were cryopreserved in 90 ml of PBS/glycerol 10% and stored at -80°C for two months. Four-week-old Wistar male rats were orally inoculated with 1 ml (corresponding to 300 mg of Human stools) of the suspension containing either ST2 (n=3), ST3 (n=3), ST4 with or without cryopreservation (n=3 for each condition) cysts or ST7 (n=3) vacuolar forms.

## **Xenic cultures of *Blastocystis*-positive animal or human feces.**

Human or rat feces were cultured in Jone's medium at 37°C in anaerobic chambers as previously described (18). After 48 h of incubation, the culture was observed by standard light microscopy (x 400). Identification of vacuolar forms revealed the presence of viable parasites

## **Detection of *Blastocystis* by quantitative PCR (qPCR).**

DNA was extracted from gastrointestinal tract contents or fecal samples using the NucleoSpin® Soil kit protocol (Macherey-Nagel SARL, Hoerd, France). DNA was amplified with LC-FastStart DNA Master SYBR green kit (Roche Diagnostics, France) and specific primers BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3') and BL18SR2PP (5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3') using a Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science, France) as described by Poirier et al (9).

## **Immunofluorescence labeling of *Blastocystis* cysts.**

Purified cyst smears were incubated with 5% milk in PBS for 1 h and washed in PBS/Triton-X100 0.1%. Then, cysts were incubated with anti-*Blastocystis* mouse polyclonal antibodies (diluted 1:200 in PBS) for 1 h at room temperature (RT), followed by three washes, and incubated with AlexaFluor 488-conjugated secondary antibody (anti-mouse IgG, 2 µg/ml in PBS) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) for 1 h at RT. Preparations were washed twice with PBS and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

## **Immunofluorescence staining of intestinal sections.**

Four weeks PI, ST4- or ST3-infected rats were euthanized and the intestine was prepared as “Swiss rolls” of 4 cm and fixed by incubating in PFA 4% during 24 h. Then, the rolls were transferred in sucrose 30% during 24-48 h at 4°C. Finally, the rolls were included in OCT compound (CellPath®, Newton, United Kingdom). Sections of OCT-embedded intestine were incubated with 5% milk in PBS for 1 h, and then washed in 0.1% Triton-X100 in PBS. Anti-*Blastocystis* mouse polyclonal antibodies (diluted 1:200) were added for 1 h at RT, washed, and incubated further 1 h at RT with AlexaFluor 546-conjugated secondary antibody (diluted 1:1000) (anti-mouse IgG, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA). Sections were washed and then incubated with fluorescein phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA) diluted 1:100 in PBS during 20 min. Finally, sections were washed and stained with DAPI. For each ST, six sections of duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon from three rats were observed.

## **Transmission electron microscopy (TEM).**

Samples were washed in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer and fixed overnight at 4°C with a mixture of 2% glutaraldehyde and 0,5% PAF in 0,2 M Sodium Cacodylate buffer. Specimens were then washed three-times in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer, post-fixed 1 h with 1% OsO<sub>4</sub> in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer, and washed three-times (10 min) in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer. Specimens were then dehydrated in a graded ethanol and acetone solution. Subsequently, they were infiltrated with acetone and EPON resin mixture (2:1) for 1 h, with acetone and EPON resin mixture (1:1) for 1 h, and with acetone and EPON resin mixture (1:2) for 1 h. Specimens were embedded in resin overnight at RT, and cured for 2 days in a 60°C oven. Thin sections (70 nm) were cut using a UC6 ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany) and stained with uranyl acetate and lead citrate. Carbone was evaporated using CE6500 unit. Specimens sections were observed at 80 kV with a Hitachi H-7650 TEM and a camera Hamamatsu AMT40. Electron microscopy preparations were all performed by the “Centre d’Imagerie Cellulaire Santé” (Clermont-Ferrand, France). All chemical products were from Electron Microscopy Science, and distributed in France by Delta Microscopies.

## Results

### **Inoculation of rats with vacuolar forms of *in vitro*-cultivated *Blastocystis* ST4.**

In all our tested conditions, oral infections with vacuolar forms of *Blastocystis* ST4 axenic cultures failed (**Table 4**) even in animals pretreated with molecules which increase intragastric pH (cimetidine 50 mg/kg or sodium bicarbonate 0.2 M). To confirm the absence of parasites, we performed a follow-up of the parasite course through the intestinal tract of rats from 3 h to 24 h post-infection (PI) by xenic culture and qPCR. Even though high parasite loads were inoculated ( $10^7$  per animal), xenic culture and qPCR were all negative suggesting that vacuolar forms are not able to pass through the stomach alive (**Table 5**). After treatment with cimetidine or sodium bicarbonate, qPCR analysis revealed the presence of *Blastocystis* DNA in the caecum of rats 6 h PI but no viable parasitic form was observed after xenic cultures from collected caecum contents (**Table 5**). To avoid stomach passage, ST4 vacuolar forms were directly inoculated into the caecum of rats, but here again all animals remained uninfected (**Table 4**). These data suggest that vacuolar forms are not able to infect rats in our experimental conditions.

### **Infection of mice and rats with purified cysts isolated from human stool samples.**

We optimized a protocol of purification as described previously by adding another Percoll gradient step and a treatment with an antibiotic cocktail (**Figure 14**). This protocol decreased drastically the number of bacteria below 250 CFUs inoculated per

animal (data not shown). From 50 g of human stool about 4 million cysts were purified for each subtype (**Figure 15A**). The size of purified cysts ranged from 2 to 7  $\mu\text{m}$  and cysts were characterized by the presence of two or four nuclei (**Figure 15B**). Both juvenile (four-week-old) and adult (twelve-week-old) rats were successfully infected by oral inoculation of  $10^5$  cysts of *Blastocystis* ST2, ST3 and ST4 per animal (**Table 4**). Cultures of feces collected 8 weeks after oral inoculation of cysts were positive for *Blastocystis*, confirming a chronic infection by the parasite

We then evaluated the minimal inoculum for both ST3 and ST4 by using infectious dose ranging from  $10^2$  to  $10^5$  purified cysts per animal. Interestingly, rats were chronically infected with the lowest cyst inoculum of ST4 ( $10^2$ ), whereas higher inoculum of ST3 ( $10^5$ ) was required for the establishment of infection (**Table 4**).

During all experiments, only cystic forms were observed in feces from infected rats for both *Blastocystis* subtypes. Indeed excreted cysts in rat feces were characterized by light microscopy and immunofluorescence labeling using polyclonal antibodies. Cysts from ST3 and ST4 infected rats were similar in size to those isolated from human stools and were also characterized by the presence of two to four nuclei (**S1 Fig.**).

The same infection protocol was further applied to 3 different genetic mice backgrounds, C57BL/6, BALB/c and C3H mice (**Table 4**). However, we were not able to obtain any infection, suggesting that immunocompetent mice could be resistant to infection by these ST4 *Blastocystis* strains.

## Transmission between animals by co-housing experiments or oral inoculation.

Eight-week-old ST3 (n=2) or ST4 (n=2) infected rats were co-housed with eight-week-old naive rats (n=4 per subtype) during six weeks. Infections were monitored by microscopy observation and xenic cultures of fecal samples. For ST4 co-housing experiments, all naive rats became infected only two weeks after the beginning of the experiment, whereas only 1/4 naive rat became infected with ST3, 6 weeks after the beginning of the experiment (**Table 4**).

Naive eight-week-old rats (n=3 for each subtype) were also orally inoculated with feces from ST3 or ST4 infected rats. Only ST4-inoculated rats were infected (**Table 4**).

## Fecal microbiota transplantation from human to rats.

Four-week-old rats were orally inoculated with fresh human stools containing *Blastocystis* ST2, ST3, ST4 or ST7, mimicking fecal microbiota transplantation. Both cystic and vacuolar forms were present in ST2, ST3 and ST4 human positive stools. In contrast, only vacuolar forms were observed in ST7-positive stools. Infection monitoring was done following FMT by xenic cultures of rat feces. Vacuolar forms were detected in culture feces from ST2, ST3 and ST4 infected rats but no viable parasite was identified in ST7-inoculated rat feces (**Table 4**).

Interestingly, we also performed FMT from Human to rat after cryopreservation of *Blastocystis* ST4 stools, by following the recommended protocol for Human to Human FMT (22). After 2 months at -80°C, stools were thaw out and transferred to naive rats. All animals were infected, suggesting that the procedure of cryopreservation use for Human to Human FMT also maintain *Blastocystis* alive.

## Colonization of the intestinal tract by *Blastocystis*.

Both ST3- and ST4-infected rats by purified cysts from human stools were sacrificed four weeks PI. Full gastrointestinal tract was collected and “Swiss rolls” were performed on duodenum, jejunum, ileum, caecum, proximal and distal colon. *Blastocystis* vacuolar forms were observed from duodenum to distal colon for both ST3 and ST4 (**S2 Fig.**). Immunofluorescence labeling revealed that parasites were mainly localized in the intestine lumen (**Figure 16A**), and sometime in close contact with epithelial cells (**Figure 16B**). No invasive form was observed. Transmission electron microscopy performed on colonic sections confirmed the presence of parasites in the lumen (**Figure 16C**) and in close contact with epithelial cells (**Figure 16D**).

## Discussion

Animal models are essential for a better understanding of the pathogenic potential of *Blastocystis* spp which still remains controversial. Rats (Wistar strain being the most common) (17, 20–24), mice (25–29), guinea pigs (30) and chickens (21) were previously demonstrated as potential models of *Blastocystis* infection. However, to date (31) there is no standardized animal infection model for *Blastocystis*, suggesting difficulties in the establishment or reproducibility of these models.

In the present study, we aimed to provide a robust and well-described protocol to obtain efficient and reproducible experimental infection with *Blastocystis* spp. Four different human *Blastocystis* STs were used in our experiments, including ST3, the most common ST found in human, followed by ST2 and ST4, the latter reported to be highly prevalent in Europe (7–9), and ST7 whose whole genome was the first sequenced (31,32). ST4 was also used because it is the most prevalent ST found in rodents and its whole genome was recently sequenced (33). Parasites used in our study originated from axenic cultures (ST4-WR1, first isolated from a laboratory rat) (15) or were isolated from human stools by a highly efficient purification process (ST2, ST3 and ST4) adapted from Yoshikawa et al (17).

Based on the literature and the easiest models to handle in an animal facility, we focused on common rodent models with rats and mice. We were not able to infect rats with the axenic ST4 WR1 strain. In our *in vitro* culture conditions that strain only produced vacuolar forms. Then, failures in animal infections could be explained by sensitivity of vacuolar forms to gastric pH, but also to oxygen exposure during inoculum preparation (1, 34). Indeed, studies have shown that rat stomach pH ranged from 3.2 - 3.9 (35). However, we also failed to infect animals with ST4 WR1 by increasing the



intra-gastric pH or after intracaecal injection of parasites. Then, we hypothesized that long-term culture and/or axenization of vacuolar forms may have attenuated the infectious potential of the ST4 WR1 strain. Indeed, the maintenance of the parasites *Trypanosoma cruzi* and *Entamoeba histolytica* in laboratory cultures led to gene expression changes and decreased infectivity (36–38). However, previous studies have reported successful infections of rats using axenic *Blastocystis* strains (25, 29, 39). We cannot exclude that some axenic strains may conserve their infectious potential, or may produce cysts in axenic culture conditions. Indeed, cyst is considered to be the main infectious stage, responsible for feco-oral contamination between hosts (17, 20, 21, 23, 24, 40). Different protocols have been described for cyst isolation from human stool samples (17, 25). We optimized Yoshikawa's protocol in order to decrease cyst-associated bacteria (17). Then, an additional Percoll step was performed and purified cysts were incubated with a wide spectrum antibiotic cocktail targeting both aerobic and anaerobic bacteria. Moreover, successful infections following this treatment demonstrated low impact of this antibiotic treatment on *Blastocystis* cyst viability.

We were able to infect rats with ST2, ST3 and ST4 cysts by using high parasite load (10<sup>5</sup> cysts/animal). Infected animals were followed as long as 8 weeks post-infection. Animals excreted *Blastocystis* cysts until the end of experiments, confirming the establishment of a chronic infection in our model.

Our results reinforced that ST4 infection failures were not related to a resistance mechanism, but more likely to the stage used or long-term *in vitro* cultivation. The susceptibility of animals to *Blastocystis* was reported to be age-dependent by Moe et al., but these authors didn't mention the *Blastocystis* ST used in their experiments (25). In our study, we were also able to infect twelve-old-week rats with *Blastocystis*

ST4 cysts, suggesting that at least for this ST, age is not a limiting factor. However, the effects of aging on susceptibility to ST3 infection remain to be investigated. Interestingly, rats were infected with as low as 102 ST4 cysts per animal, whereas the minimal inoculum dose required for infection with ST3 reached 105 cysts suggesting host adaptation. Transmission between animal by co-housing experiments and oral inoculations confirm our hypothesis. Transmission between animal by co-housing experiments and oral inoculations confirm our hypothesis. These results may explain why ST4 is the more prevalent than ST3 in rodents (41). However, oral inoculation with less than 102 ST4 cysts per rat remains to be investigated, but a previous work has shown that infection efficiency with 10 cysts of ST4 RN94-9 or ST4 NIH:1295:1 strains varies between 20-100% (17).

Our results suggest that even though host barrier is not critical for *Blastocystis* infection, some STs are more adapted to particular hosts. Then, we applied our purification protocol to infect 3 strains of mice. The first one was juvenile BALB/c mice that have been shown to be more susceptible to parasite infections (42, 43) such as *Blastocystis* (25,39). We also used C3H mice that have been described to be susceptible to *Entamoeba histolytica* (44) and *Giardia intestinalis* (45). Finally, C57BL/6 mice, being the most used genetic background for transgenic mice, were also used. However, we were not able to infect mice even with high ST4 cyst inoculum (105/animal), suggesting that mice would be resistant to the ST4 strain used in our study. A recent study has shown that the Dextran Sodium Sulfate (DSS) treatment result in biophysical changes in mucus layer (increased penetrability to microorganism), increasing susceptibility of mice to *Blastocystis* ST7 colonization for at least 3 days after intra-cecal injection (46). These results suggest that mucus layer play in important role in the resistance of mice for *Blastocystis* persistence.

Immunofluorescence labelling revealed the presence of the parasites (ST4 or ST3) all along the intestinal tract of infected animals. *Blastocystis* were detected in the intestinal lumen and in close contact with epithelial cells. Granular forms presenting empty vacuoles or vacuoles containing electron-dense granules as described previously by Tan (1), were observed in direct contact with epithelial cells.

Moreover, FMT experiments highlighted the capacity of *Blastocystis* to overcome barrier microflora and infect a new host, even though its microbiota is not altered. We also demonstrated that cryopreservation procedure used for the stool storage before Human to Human FMT keep *Blastocystis* alive and able to infect a new host (19). These data support the recent recommendations for the screening of fecal donors by confirming the ability of *Blastocystis* to be directly transmitted through stools (19).

In conclusion, our work provides a well-documented and reproducible animal model of *Blastocystis* chronic infection, reproducing “natural” infection. This model will be of great interest to decipher the host-parasite-microbiota interactions, and to better evaluate clinical significance of *Blastocystis*.

## Acknowledgements

This work was achieved by obtaining a co-financing Region Auvergne-Rhône-Alpes and FEDER in 2015 (“Thématiques émergentes”). MD and EB were supported by grants from the Region Auvergne-Rhône-Alpes.

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm and Université Clermont Auvergne [UMR1107, UMR1071]; INRA [USC-2018]; CNRS [UMR6023].

Electron microscopy preparations were all performed by the “Centre d’Imagerie Cellulaire Santé” (CICS, Clermont-Ferrand, France).

## References

1. Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Oct;21(4):639–65.
2. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis* hominis revisited. *Clin Microbiol Rev.* 1996 Oct;9(4):563–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894352>
3. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.* 2013;1(5):167–78. <http://tai.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/2049936113504754>
4. 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 Apr;126(1):11–8.
5. 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 Mar;39(4):473–9. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751908002762>
6. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int.* 2016;65(6):763–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
7. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect Genet Evol.* 2016 Jul;41:32–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27034056>
8. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz 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 Oct 27;105(4):949–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471964>
9. Olsen KEP, Christiansen DB, Nielsen HV, Stensvold CR. *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Jun 1;84(6):883–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633023>
10. 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 Mar 1;49(3):975–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177897>
11. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo 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(11).
12. Padukone S, Mandal J, Parija SC. Severe *Blastocystis* subtype 3 infection in a patient with

- colorectal cancer. *Trop Parasitol*. 2017;7(2):122–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29114493>
13. Rostami A, Riahi SM, Haghighi A, Saber V, Armon B, Seyyedtabaei SJ. Erratum to: the role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res*. 2017 Sep 18;116(9):2611–2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28725935>
  14. Mohamed AM, Ahmed MA, Ahmed SA, Al-Semany SA, Alghamdi SS, Zagloul DA. Predominance and association risk of *Blastocystis* hominis subtype I in colorectal cancer: a case control study. *Infect Agent Cancer*. 2017 Dec 12;12(1):21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28413436>
  15. Ajjampur SSR, Tan KSW. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int*. 2016 Dec;65(6):772–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27181702>
  16. Chen XQ, Singh M, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Moe KT, et al. Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitol Res*. 1997;83(4):313–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134551>
  17. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 2006 Feb;157(1):77–85. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1434461005001100>
  18. Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis* hominis in rats. *Parasitol Res*. 2004;94(6):391–6.
  19. Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis*: Isolation, Xenic Cultivation, and Cryopreservation. In: *Current Protocols in Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 20A.1.1–20A.1.8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858970>
  20. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*. 2017 Apr;66(4):569–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087657>
  21. Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M. *Parasitology*. 1993;456–60.
  22. 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(2):107–12.
  23. 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(1):135–40.
  24. 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(5):853–60.
  25. Chandramathi S, Suresh KG, Mahmood AA, Kuppusamy UR. Urinary hyaluronidase activity in rats infected with *Blastocystis* hominis-evidence for invasion? *Parasitol Res*. 2010;106(6):1459–63.
  26. 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(4):319–25.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134552>

27. Pavanelli MF, Kaneshima EN, Uda CF, Colli CM, Falavigna-Guilherm AL, Gomes ML. Pathogenicity of *Blastocystis* sp. to the gastrointestinal tract of mice: relationship between inoculum size and period of infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015 Dec;57(6):467–72.  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652015000600467&Ing=en&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000600467&Ing=en&tIng=en)

28. Moe KT, Singh M, Gopalakrishnakone P, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Cytopathic effect of *Blastocystis* hominis after intramuscular inoculation into laboratory mice. *Parasitol Res.* 1998 Jun;84(6):450–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660133>

29. Abou El Naga IF, Negm AY. Morphology, histochemistry and infectivity of *Blastocystis* hominis cyst. *J Egypt Soc Parasitol.* 2001 Aug;31(2):627–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478461>

30. Yao F, Qiao J, Zhao Y, Zhang X, Yang J, Li X. [Experimental infection of mice with *Blastocystis* hominis]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 2005 Dec 30;23(6):444–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566218>

31. Phillips BP, Zierdt CH. *Blastocystis* hominis: pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Exp Parasitol.* 1976 Jun;39(3):358–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1269579>

32. Denoed 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(3):R29. <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-3-r29>

33. Wawrzyniak I, Roussel M, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KSW, et al. Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis* hominis. *Int J Parasitol.* 2008 Oct;38(12):1377–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694756>

34. 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. *Genomics Data.* 2015 Jun;4:22–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26484170>

35. Zierdt CH. *Blastocystis* hominis--past and future. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jan;4(1):61–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004348>

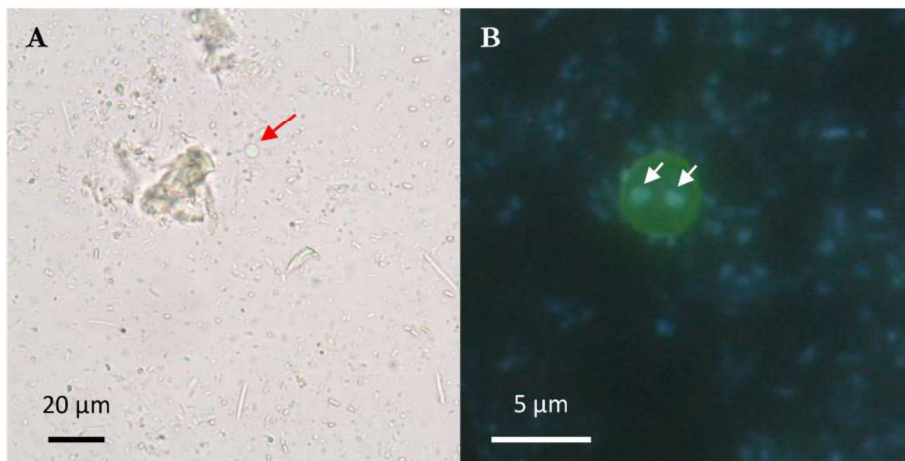
36. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol.* 2008 Jan;60(1):63–70. <http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.60.1.0008>

37. Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. Trypanosoma cruzi: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93(6):753–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921298>

38. Olivos A, Ramos E, Nequiz M, Barba C, Tello E, Castañón G, et al. Entamoeba histolytica: mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Exp Parasitol.* 2005 Jul;110(3):309–12. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489405000822>

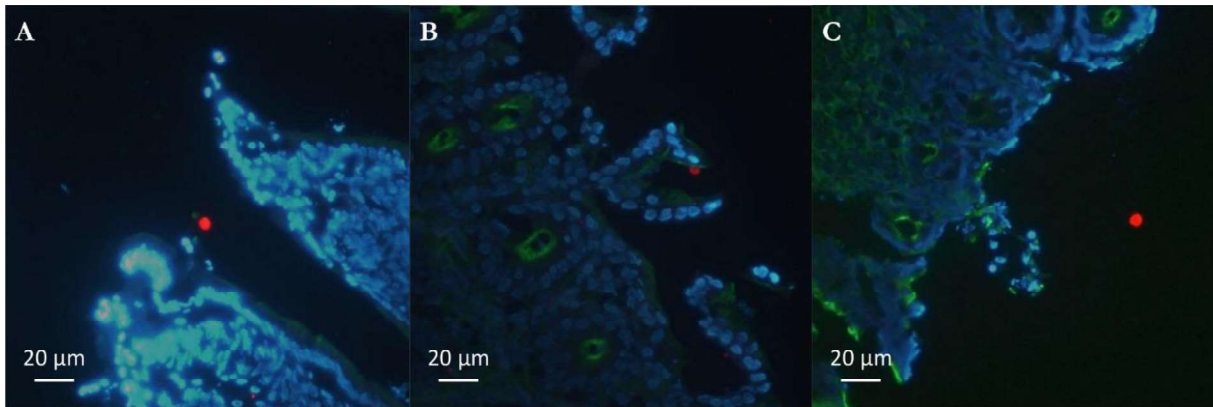
39. Santos HJ, Rivera WL. Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis* hominis in sera and intestinal secretions of orally infected mice. *Parasitol Res.* 2009 Oct 14;105(5):1303–10. <http://link.springer.com/10.1007/s00436-009-1556-0>
40. Li J, Deng T, Li X, Cao G, Li X, Yan Y. A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol Res.* 2013;112(10):3537–41.
41. 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 Dec 1;65(6):780–4. <https://www.sciencedirect.com/gate2.inist.fr/science/article/pii/S1383576916300381?via%3Dihub#bb0045>
42. Sherwood D, Angus KW, Snodgrass DR, Tzipori S. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect Immun.* 1982 Nov;38(2):471–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7141705>
43. Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* 1999 Feb;1(2):141–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594978>
44. Ivory C, Kammanadiminti S, Chadee K. Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. *Trends Parasitol.* 2007 Feb;23(2):46–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185037>
45. Sharma AW, Mayrhofer G. A comparative study of infections with rodent isolates of *Giardia duodenalis* in inbred strains of rats and mice and in hypothyroid nude rats. *Parasite Immunol.* 1988 Mar;10(2):169–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2967456>
46. 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. Renia L, editor. *PLoS One.* 2016 Aug 10;11(8):e0160458. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508942>

## Supporting information



**S1 Fig: *Blastocystis* ST4 cysts from experimentally infected rats.** (A) Cysts (red arrow) from rats observed by light microscopy. As purified cysts from human stools, size ranged from 2 to 7 µm. (B) Cysts from rats observed by immunofluorescence after labeling with mouse polyclonal anti-*Blastocystis* ST4 antibodies (Green) and DAPI staining (Blue). Cysts contained two to four nuclei (white arrows, two on this picture).





**S2 Fig: Intestinal sections from *Blastocystis* ST4-infected rats.** Sections of the intestinal tract were stained with fluorescein phalloidin (Green), DAPI (Blue) and mouse polyclonal anti-*Blastocystis* ST4 antibodies (Red). Parasites were detected in small intestine (A), in caecum (B) and colon (C) in the lumen or in close contact with the intestinal epithelium.

---

## Article 2: *Blastocystis* infection induces intestinal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in animal model

---

Les douleurs abdominales chroniques, souvent associées à de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), sont généralement décrites comme mal localisées et diffuses et elles peuvent survenir dans le cadre de nombreux troubles gastro-intestinaux tels que les MICI ou le SII (Johnson et Greenwood-Van Meerveld, 2016). Le SII est aujourd'hui un réel problème de santé publique puisqu'il est l'un des troubles les plus fréquemment rencontrés dans les services de gastroentérologie et qu'il affecte de manière importante la qualité de vie des patients. Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle qui se caractérise par des douleurs abdominales et des troubles du transit en l'absence de lésions macroscopiques (Enck *et al.*, 2016). Les patients atteints de SII sont classés en sous-groupes en fonction de leur trouble du transit : les patients SII à prédominance de diarrhée (SII-D), les patients SII à prédominance de constipation (SII-C), les patients SII avec alternance de diarrhées et de constipation (SII-M) et les patients SII dit non classés ne présentant pas de modification de leur transit intestinal (SII-U) (Drossman, 2016). La physiopathologie de ce syndrome reste encore complexe. Les patients atteints de SII présentent des altérations de la perméabilité intestinale, une inflammation de bas grade ainsi que des modifications de la composition et de la fonction du microbiote intestinal (Enck et Mazurak, 2018; Enck *et al.*, 2016).

La physiopathologie est d'autant plus complexe que le SII est une pathologie multifactorielle. Ainsi, il est communément admis que les gastroentérites infectieuses sont un facteur de risque dans le développement du SII, on parle alors de SII-post-infectieux (SII-PI) (Lee *et al.*, 2017b). Le SII-PI peut en effet survenir dans 4 à 31% des cas suite à une gastroentérite aigüe (Dunlop *et al.*, 2006a; Spiller et Garsed, 2009; Zanini *et al.*, 2012). De nombreuses études ont montré l'impact d'agents pathogènes sur l'intégrité de la barrière épithéliale, l'activation du système immunitaire et le microbiote intestinal (Bercík *et al.*, 2004; Downs *et al.*, 2017; Ohman et Simrén, 2010; Parry *et al.*, 2003). Ces perturbations ont été répertoriées suite à des gastroentérites d'origine bactérienne (*Shigella*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*) ou encore des infections parasitaires (*Giardia duodenalis*) (Downs *et al.*, 2017).

Par ailleurs, il a été montré que suite à une infection parasitaire, 40% des patients développaient un SII contre 15% dans le cadre d'une infection bactérienne (Klem *et al.*, 2017).

*Blastocystis* est le parasite le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme (Tan, 2008). Cependant son implication en santé humaine reste très controversée. Depuis quelques années l'intérêt scientifique pour ce parasite n'a cessé de croître suite aux études mettant en évidence une plus forte prévalence de ce parasite chez les patients atteints de SII comparés à des individus contrôles (Nourrisson *et al.*, 2014; Ragavan *et al.*, 2015; Rostami *et al.*, 2017; Yakoob *et al.*, 2004, 2010). Par ailleurs, les patients porteurs de *Blastocystis* présentent, comme décrit chez les patients SII, des douleurs abdominales ainsi qu'une dysbiose intestinale (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018; Nourrisson *et al.*, 2014; Toro Monjaraz *et al.*, 2018). En effet, Nourrisson *et al.*, ont mis en évidence une réduction de l'abondance relative du genre *Bifidobacterium* et de l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérie productrice d'AGCC, chez les individus porteurs de *Blastocystis* (Nourrisson *et al.*, 2014). De plus, une récente étude a décrit une réduction des taux d'AGCC fécaux chez les porteurs de ce parasite (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). Tous ces résultats suggèrent donc une contribution de *Blastocystis* dans le développement du SII (Poirier *et al.*, 2012).

Dans cette étude, nous avons utilisé des rats infectés expérimentalement par *Blastocystis* afin de déterminer si l'infection peut conduire au développement d'une HSVC associée à une dysbiose intestinale dans le but de développer un nouveau modèle murin de SII d'origine infectieuse. En effet, nous avons mis en évidence que *Blastocystis* ST4 induisait une HSVC sans origine inflammatoire chez les rats infectés. De plus, les animaux développaient un comportement type anxio-dépressif corrélé à l'HSVC. La dysbiose intestinale associée à l'infection se caractérisait par l'augmentation de la richesse bactérienne et la diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. De manière intéressante, nous avons corrélé l'HSVC à l'augmentation de l'abondance relative du genre *Bacteroides* et à la diminution de l'abondance relative de la famille des *Clostridiaceae*, bactéries productrices d'AGCC. Ces derniers ont été alors dosés et nous avons retrouvé une diminution des concentrations d'AGCC fécaux chez les rats infectés. Cette diminution a été corrélée à l'abondance relative du genre *Oscillospira* qui a été également décrite comme augmentée chez les individus infectés. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité de protéases à sérine dans les fèces des animaux infectés pouvant expliquer l'HSVC.

Ces données suggèrent qu'une infection gastro-intestinale par *Blastocystis* serait associée à la mise en place d'une HSVC et d'une dysbiose intestinale. Ainsi, ce nouveau modèle d'infection pourrait être un bon modèle de SII d'origine infectieuse et pourrait donc contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies chroniques de l'intestin chez certains individus.

# ***Blastocystis* infection induces intestinal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in animal model**

Manon Defaye<sup>1,2</sup>, Céline Nourrisson<sup>1,3</sup>, Elodie Baudu<sup>2,4</sup>, Amandine Lashermes<sup>2</sup>, Mathieu Meleine<sup>2</sup>, Ivan Warwzyniak<sup>1</sup>, Virginie Bonnin<sup>4</sup>, Julie Barbier<sup>2</sup>, Agathe Gelot<sup>2</sup>, Nicolas Barnich<sup>4</sup>, Denis Ardid<sup>2</sup>, Mathilde Bonnet<sup>4</sup>, Frédéric Delbac<sup>1</sup>, Frédéric Antonio Carvalho<sup>2,&,\*</sup> and Philippe Poirier<sup>1,3,&,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Micro-organismes : Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm U1107, NeuroDol, Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, CHU, CNRS, Laboratoire Micro-organismes : Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, Clermont-Ferrand, France

Corresponding Author:

\* Corresponding authors: ppoirier@chu-clermontferrand.fr ; Tel: +33 4 73 75 01 95

frederic.carvalho@uca.fr ; Tel: +33 4 73 17 81 03

& These authors contributed equally to this work

## Abstract

**BACKGROUND & AIMS:** Infectious gastroenteritis is a risk factor for development of Irritable Bowel Syndrome (post-infectious-IBS). Recent clinical studies described a high prevalence of *Blastocystis* in IBS patients. Here we investigated using an animal model the link between *Blastocystis*, colonic hypersensitivity (CHS) and microbiome changes.

**METHODS:** Rats were orally infected with *Blastocystis* subtype 4 cysts. Colonic sensitivity was evaluated by colorectal distension one month post-infection. Animal behavior was assessed using a behavioral recognition system (PhenoTyper®), Elevated Plus Maze and Forced Swimming test. Feces were collected to study microbiota composition by 16S Illumina® sequencing, and for metabolite analyses. At the end of the experiment, animals were euthanized and colon were sampled for mediator quantifications and tight-junction analysis.

**RESULTS:** *Blastocystis* infected animals displayed non-inflammatory CHS with a decrease in occludin expression. *Blastocystis* infection was associated with anxiety and depressive-like behavior. Analysis of fecal microbiota composition revealed an increase in bacterial richness associated with altered microbiota composition, characterized by an increase in *Bacteroides*, *Oscillospira* and *S24-7*, and a decrease in *Clostridiaceae*. These bacterial genera were correlated to a decrease in short chain fatty acids levels and serine protease activity in feces from infected rats.

**CONCLUSIONS:** Our data suggest that *Blastocystis* infection in rats mimics PI-IBS with the establishment of a CHS linked to microbiota and metabolic shifts.

## Introduction

Chronic visceral pain which is frequently related to colonic hypersensitivity (CHS), is generally described as poorly localized, diffuse and stabbing sensation which may encountered in many gastrointestinal disorders such as Inflammatory Bowel Disease (IBD) and Irritable Bowel Syndrome (IBS) <sup>1</sup>.

IBS is nowadays a health care burden, representing one of the most common disorders encountered in gastrointestinal practice and highly affects quality of life. It's a functional chronic disorder defined by Rome IV criteria, which is characterized by abdominal pain and changes in bowel habits in absence of macroscopic organic lesions <sup>2</sup>. Patients are classified into subgroups: IBS-C for patients with constipation-predominant, IBS-D when diarrhea-predominant, IBS-M for patients' alternating constipation and diarrhea and IBS-U if no clear classification can be established <sup>3</sup>. Pathophysiology of IBS is complex and poorly understood, patients displaying several alterations such as disturbance of gut epithelial barrier increasing intestinal permeability, immune activation and modifications of intestinal microbiota composition and function <sup>2-4</sup>. Then, symptom origin is thought to be multifactorial and is still not well defined for the different subtypes.

Infectious gastroenteritis constitute a key risk factor for development of IBS; this subset is referred as post-infectious IBS (PI-IBS) <sup>5</sup>. PI-IBS often exhibits characteristics of the IBS-D, and can occur in 4%-31% of patients following infectious acute gastroenteritis <sup>6-8</sup>. Several studies support a role for pathogen-mediated modifications in the resident intestinal microbiota, epithelial barrier integrity and immune activation in PI-IBS <sup>9-13</sup>. The role of some pathogens is now well established, such as bacteria with *Shigella* spp., pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* or

protozoa as *Giardia duodenalis* <sup>12</sup>. Despite bacterial infection is frequently related to development of PI-IBS, the risk of IBS was reported to be highest with protozoal enteritis in a meta-analysis <sup>14</sup>.

*Blastocystis* spp. is the most frequent enteric protist found in the intestinal tract of humans and various animal <sup>15</sup>. It has been classified into 17 subtypes (ST) based on small subunit ribosomal RNA-encoding gene. Subtypes ST1 to ST9 and ST12 have been recovered in human stool samples, ST3 being the most frequent, followed by ST1, ST2 and ST4 <sup>16-18</sup>. Interestingly, ST4 has been reported to be the most frequent ST in some studies performed in Europe, with higher parasite loads compared to other ST <sup>19-22</sup>. It is also the predominant ST found in rodents <sup>23, 24</sup>. *Blastocystis* spp. prevalence in human ranges from 0.5% to 100% between countries, according to hygienic conditions and sanitary practices <sup>16, 18, 25</sup>. However, the involvement of *Blastocystis* spp. in human diseases is highly debated. Interest of the scientific and medical communities in *Blastocystis* spp. infection increased these last few years since epidemiological studies highlighted high prevalence of this parasite in patients with IBS <sup>26-30</sup>. While *Blastocystis* infected subjects display microbiota changes, heterogenic results are reported <sup>29, 31-36</sup>. Some studies reported an increase in microbiota diversity suggesting a potential benefit for *Blastocystis*-associated microbiota <sup>22, 34, 37</sup>. However in the same time, decrease in protective bacteria was reported and a recent study describe a decrease in Short Chain Fatty Acids (SCFA) levels in fecal samples from *Blastocystis* infected patients <sup>35</sup>. SCFAs, including acetate, propionate and butyrate, enhance epithelial barrier function and immune tolerance, promoting gut homeostasis through specific mechanisms <sup>38</sup>.



In the present study, we aimed to characterize whether *Blastocystis* infection may lead to IBS-like symptoms. We first characterized non-inflammatory CHS associated to anxiety-and depressive-like behaviors in infected rats. We demonstrated that *Blastocystis* infection was associated to both microbiota and metabolic shifts that may lead to epithelial barrier impairment.

## Materials and Methods

### Animals and experimental infection.

Three-week-old specific pathogen free (SPF) Wistar male rats were purchased from Charles River Lab (Saint Germain Nuelles, France) and housed in animal biosafety level 2 (21–22°C, 12:12-h light-dark cycle) with access to food and water *ad libitum*. Animal protocols were approved by a local ethics committee (protocol number: 3003-EU0116-) and followed the guidelines of the Committee for Research and Ethical issues of the International Association for the Study of Pain <sup>39</sup>. Three days prior the beginning of the experiment, rats were pre-screened in order to ensure that they were healthy and free of *Blastocystis* or any other intestinal parasite. After a habituation week, rats were infected with *Blastocystis* ST4 cysts, purified from human stools as previously reported (Defaye *et al.*, 2018). Briefly, an asymptomatic human carriers of *Blastocystis* ST4 was enrolled for all the study by the medical laboratory of Parasitology of the Clermont-Ferrand teaching hospital (approved by the research ethics committees of the Clermont-Ferrand Hospital, “Comité de Protection des Personnes Sud-Est 6”, France, agreement ref: 2014/CE29). Fresh stools were suspended in distilled water and filtered. After being washed twice in distilled water, cysts were purified using a 3 steps density gradient purification protocol (Defaye *et al.*, 2018). After final wash, purified cysts were suspended in 0.5 ml of an antibiotic cocktail containing 0.01 g/L Vancomycin (Sandoz, Levallois-Perret, France), 0.1 g/L Amoxicillin-clavulanic acid (Sandoz, Levallois-Perret, France) and 0.1 g/L Cefotaxim (SteriMax, Oakville, ON, Canada) diluted in sterile PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated for 6 h at 4°C. Cysts were washed twice in sterile PBS by centrifugation at 300 g for 5 min and finally suspended in sterile PBS. Cysts were counted in Malassez

chamber and suspension was diluted in sterile PBS to reach a concentration of  $10^5$  cysts per milliliter. Ten microliters of the suspension were plated on LB media and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h. Only cysts purification containing below 250 CFU per milliliter were used for experiments. Then, four-week-old Wistar male rats were orally inoculated (Figure 1) with  $10^5$  cysts (n=12) or sterile PBS as control (n=12). The success of infections was confirmed by *Blastocystis* fecal cultures in Jone's medium at  $37^\circ\text{C}$ , as previously described <sup>40</sup>. After 48h of incubation, cultures were observed by light microscopy (X400). Identification of vacuolar forms indicated that rats were infected. Microscopy was confirmed with a *Blastocystis* spp. specific real-time PCR as previously described <sup>19</sup>. Body weight of animals was monitored and feces were sampled every week until euthanize and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Rats were euthanized at the end of the experiment (D30-31), and colon were collected and split to be stored at both  $-80^\circ\text{C}$  for molecular assays and in paraformaldehyde for histological analyses (**Figure 17**).

### **Colorectal distension test (CRD).**

This test aims to evaluate the visceral sensitivity by measuring the colonic response when submitted to distension. The CRD protocol was adapted for rats from Larauche *et al.*, <sup>41</sup>. At D30-31 post-inoculation (PI), rats were placed 30 minutes in a restrainer before to be anesthetized (3% Isoflurane). CRD devices were introduced into colo-rectum and connected to an amplifier (Millar Instruments, Houston, TX, USA). The CRD protocol consisted of a set of distensions at constant pressures from 20 to 80 mmHg, performed in duplicates as follow: 20 mmHg steps, 20s duration with 4.5 min inter-stimuli intervals. Data analysis was performed with Labchart® as follows. P-spectrum was extracted from raw data by applying “smoothsec” with a time constant

of 1.5s, followed by “absolute valor” and finally another “smoothsec” with a time constant of 1.5s to exclude the slower and tonic changes. Colonic response to CRD (mmHg.s) was quantified by measuring the under the curve area during 20sec of distension using the “integral relative to minimum” in Labchart®.

### **Behavior recognition system PhenoTyper®.**

The PhenoTyper® (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) is an automated infrared (IR) video-tracking system measuring behavior of animal models. This device is composed of 8 plexiglass cages (45 cm × 45 cm), each containing an opaque plastic square shelter accessible by two entrances and delimited areas for feeding and drinking. Cages are surrounded by top unit provided with IR lighting and the IR camera for video recording during the light and dark cycles. Briefly, at D26-27 PI, rats were transferred into PhenoTyper® cages (1 per cage) and animal activities were recorded with Mediarecorder® (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) for 24h, including 12h dark period and 12h light period. During this period, rats had *ad libitum* access to food, water and shelter. Raw data were analyzed with Ethovision XT® software (Version 12, Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) and various specific behaviors were compared between infected and control rats.

### **Elevated-Plus-Maze test (EPM).**

This device consisted of a central platform (10x10cm) and four arms (50x10cm). Two opposite arms were surrounded by walls (closed arms), while the others two were devoid of enclosing walls (open arms). At D28-29 PI, after an acclimatization of 45 min,

each rat was placed in the center platform facing a closed arm. Animals were recorded for 5min by Mediarecorder® software. Analysis was performed by Ethovision XT® software (version 12).

### **Forced Swimming Test (FST).**

At D28-29 PI, after an acclimatization of 45 min, each rat was placed in a glass cylinder (30cm diameter and 50cm high) containing water at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . The immobility time of rats was recorded during 6 minutes. Each rat was judged to be immobile when it stopped swimming and floated, making only those movements necessary to keep its head above water.

### **Tissue preparation for histological analysis.**

Flushed colons were opened longitudinally, cut into 4cm and rolled. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde (24 h,  $4^\circ\text{C}$ ), incubated in 30% sucrose (48h,  $4^\circ\text{C}$ ) and embedded in OCT® medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ten micrometer cross-section were mounted on SuperFrost Plus® slides (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stained with hematoxylin phloxin safran.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).**

Total proteins of colon were extracted using lysis buffer (0.5mM PMSF, 100UI/mL iniprol/aprotinine, 20µM leupeptine, 1% triton), and proteins concentrations were determined with a BC Assay Protein® quantification kit (Interchim, Montluçon, France). Colonic Interleukine-6 (IL-6) and Lipocalin-2 were quantified using enzyme linked

immunosorbent assay kit (Duoset®, R&D Systems, Minneapolis, MN) according to manufacturer's instructions. Concentrations were calculated from standard curve and normalized to the protein concentration.

### **Reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR).**

Total RNA of colon was extracted with Trizol (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA). DNase treated RNA were reverse transcribed using High capacity cDNA RT® kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) for reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). Specific cDNA were amplified for occludin (Forward 5'-AGTACATGGCTGCTGCTGATG-3'; Reverse 5'-CCCACCATCCTCTTGATGTGT-3'), *zonula occludens 1* (ZO-1) (Forward 5'-AGCGAAGCCACCTGAAGATA-3'; Reverse 5'-GATGGCCAGCAGGAATATGT-3'), GATA-3 (Forward 5'-AAGAGTGCCTCAAGTATCAG-3'; Reverse 5'-GCGGATAGGTGGTAATGG-3') and GAPDH (Forward 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'; Reverse 5'-TGATGGCAACAATGTCCACT-3'). qPCR were performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green supermix® (Biorad, Hercules, CA, USA) and carried out on CFX96 Touch® Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, CA, USA). Relative quantifications of both occludin, ZO-1 and GATA-3 genes were expressed as fold-induction, using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method with GAPDH as reference gene.

## Fecal microbiota analyses.

DNA was extracted from rat feces collected at D0 and D30-31 PI using the NucleoSpin® Soil kit protocol (Macherey-Nagel SARL, Hoerdt, France), including a bead beating step. Illumina® high throughput sequencing were performed by MRDNA lab (Shallowater, TX, USA) on a MiSeq® following the manufacturer's guidelines. Briefly, the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using 515F/806R primer pair and HotStarTaq Plus Master Mix® Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) under the following conditions: denaturation 94°C/3min, followed by 28 cycles of 94°C/30sec, 53°C/40sec, and 72°C/1min, with a final elongation step 72°C/5min. After quality checks, pooled PCR products were purified using calibrated Ampure XP® beads. Illumina® sequencing was performed and DNA libraries build by following Illumina TruSeq DNA library® preparation protocol.

We performed microbiota analyses on Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, version 1.8.0) software package <sup>42</sup>. In summary, sequences were demultiplexed to remove barcodes and primers. Chimeric sequences were removed using USEARCH61 <sup>43</sup>. Sequences were clustered using USEARCH61 with a 97% homology threshold <sup>44</sup>. Taxonomic analyses were performed using the Greengenes reference database (version 13-8).

Alpha diversity measures the richness of unique microbial taxa within a sample. Observed Operational taxonomic units (OTUs) measurements were determined with QIIME using an OTU table rarefied at various depths. Areas under the curves were calculated for each rarefaction curve. Beta diversity measures the variation in microbiota composition between individual samples. Unweighted UniFrac distances between samples were computed to measure beta diversity using rarefied OTUs table

count. Principal coordinates analyses (PCoA) were used to further assess and visualize beta diversity. Groups were compared for distinct clustering using Adonis.

### **Short chain fatty acids (SCFA) analyses.**

We quantified acetate, propionate and butyrate from rat feces collected at D0 and D30-31 PI. Briefly, almost 200mg of fecal samples were diluted in 200µl of distilled water, vortexed and stored during 2 hours at 4°C. After centrifugation, supernatants were precipitated overnight with phosphotungstic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and centrifuged to obtain a clear supernatant.

One microliter of the clear supernatant was used to analyze SCFA composition using a gas liquid chromatography (Agilent technologies 6850 Network GC system, Agilent technologies, Santa Clara, SA, USA) equipped with a split-splitless injector, a flame-ionization detector and a capillary column (30m; 0,25 mm; 0,25 µm) impregnated with nitroterephthalic acid modified polyethylene glycol (Agilent J&W DB-FFAP column, 122-3232E, Agilent technologies, Santa Clara, SA, USA). Carrier gas (Helium) flow rate was 0,7ml/min and inlet, column and detector temperatures were 175, 100 and 240°C, respectively. Volatile free Acid mix CRM46975 was used as the internal standard (Supelco. Saint-Quentin-Fallavier, France).

Data were collected and peaks integrated using the OpenLAB® software (Agilent technologies, Santa Clara, SA, USA). Values are expressed in M/g of feces and ratio was calculated between D30-31 and D0.



## **Serine protease activity assay.**

Almost 200mg of feces were diluted in 1ml of distilled water, homogenized and centrifuged at 13000 rpm for 5 minutes. One hundred microliters of fecal supernatants were added to 100µl of buffer (50mM Tris-HCL pH 8, 1mM CaCl<sub>2</sub>) containing 100µM specific serine protease substrate (suc-phe-ala-ala-phe-pNA) (Bachem, Switzerland) and incubated at 37°C for 6 hours. Substrate cleavage was measuring at 400 nm using 96 well plate NUNC® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA) and normalized to the feces weight.

## **Statistical analysis.**

Statistical analyzes were performed with Prism 7® software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data are expressed as means ± Standard Error Mean (SEM). Colonic sensitivity to gradual CRD, body weight, distance moved, duration in hidden zone and microbiota analysis (taxonomy) were analyzed using a two-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* test for multiple comparisons. Rate comparisons were performed using Fisher's exact test. Most comparisons were performed by Student test. For data sets that were non-Gaussian data were compared using the non-parametric test Mann Whitney U test for unpaired data. A p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### ***Blastocystis* infection induces non-inflammatory colonic hypersensitivity with a decrease in occludin expression.**

Multiple factors participate to the CHS observed in IBS patients <sup>45-47</sup>. To assess the influence of *Blastocystis* on colonic sensitivity, we infected four-week-old Wistar rats with  $10^5$  ST4 cysts purified from a healthy human carrier. Infection monitoring revealed the presence of parasites until sacrifice 4 weeks PI (**data not shown**). At D30-31 PI, colorectal distension (CRD) test showed that intracolonic sensitivity was significantly increased in *Blastocystis* infected rats (**Figure 18A**). Areas under the curve (AUC) were  $35.95 \pm 3.37$  in control rats and  $67.42 \pm 6.79$  in infected rats ( $p < 0.01$ , T-test) (**Figure 18B**). It has been proposed that incomplete resolution of the immune response following infectious gastroenteritis leads to a persistent low grade inflammation, contributing to colonic hypersensitivity in PI-IBS <sup>12</sup>. Surprisingly, infection had no effect on the body weight (**Supplementary Figure 1A**), colon weight (**Supplementary Figure 1B**) or length (**Supplementary Figure 1C**), and was not associated to histological changes (**Supplementary Figure 1D**). Serum levels of IL-6 and lipocalin-2 proteins were not modified in infected rats (**data not shown**), and while colonic levels of both proteins tended to be higher in infected animals, the difference was not significant (**Figure 18C and 18D**). Moreover GATA-3 mRNA expression was not significantly higher in infected rats, confirming the absence of marked intestinal inflammation in infected rats (**Figure 18E**).

PI-IBS symptoms are closely related to those observed with IBS-D, suggesting an alteration of intestinal barrier <sup>5</sup>. In our study, we performed mRNA quantifications of tight junction components. While mRNA levels of ZO-1 were not modified significantly in infected animals, we observed a strong decrease in occludin expression ( $p < 0.001$ ) (**Figure 18F and 18G**). These results suggest that *Blastocystis* infection may lead to an impairment of the intestinal barrier in rat.

### ***Blastocystis* infection induces behavioral changes.**

It is well established that individuals with IBS have higher levels of anxiety and depression compared to healthy controls <sup>48, 49</sup>. To analyze the impact of *Blastocystis* infection on behavior, experiments using PhenoTyper® were performed at D26-27 PI. Infected rats did not present any significant differences in travelled distances (**Figure 19A**), spent time in hidden zone (**Figure 19B**), velocity (**Figure 19C**), drinking and eating behaviors (**Supplementary Figure 2A and 2B**). However, grooming, rearing and sniffing duration (**Figure 19D, 19E, 19F**) and frequency (**data not shown**) were significantly decreased during dark period. The decrease in these three behaviors was suggestive of anxiety- and depression-like troubles. These hypotheses were confirmed with both EPM and FST assays at D28-29 PI. In EPM test, infected rats entered the open arms less frequently and spent significantly less time in them (**Figure 19G and 19H**), indicative of an anxiety-like behavior. Interestingly, the AUC from CRD significantly correlated with the entry frequency in EPM open arms (**Figure 19I**). Moreover, immobility time during FST was increased in infected rats (**Figure 19J**), indicative of a depressive-like behavior.

## ***Blastocystis* infection is associated to fecal microbiota modifications in rats.**

Pathophysiology of IBS is complex, in absence of low grade inflammation, visceral pain may be explained by switches fecal microbiota composition resulting in metabolome changes <sup>50</sup>. Differences in human microbiota from *Blastocystis* carriers have been reported in recent studies, but no causality link between its presence and microbiota composition has been established so far <sup>22</sup>. To evaluate the influence of *Blastocystis* infection on intestinal microbiota, fecal microbiota composition of both infected and control rats was characterized by Illumina® sequencing. At D0 (before infection), none difference in fecal microbiota composition was observed between both groups (**Supplementary Figure 3**). At D30-31 PI, bacterial richness was significantly increased in infected rats ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test) (**Figure 20A and 20B**). Moreover, Principal component analysis (PCoA) of beta-diversity clearly demonstrated significant difference (Adonis,  $p=0.001$ ) in the evolution of microbiota composition between infected and control rats (**Figure 20C**). This was supported by a significant increase in *Bacteroidetes* and a decrease in *Firmicutes* in infected animals (**Figure 20D**). At the genus level, we observed a significant decrease in the relative abundance of Unclassified *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae* and *Turcibacter* in infected rats, whereas Unclassified *S24-7*, *Oscillospira* and *Bacteroides* were significantly increased (**Figure 20E**). Interestingly, the AUC from CRD significantly correlated with the increased in relative abundance of *Bacteroides* (**Figure 20F**) and the decrease in Unclassified *Clostridiaceae* (**Figure 20G**).

Moreover, switches in microbiota composition of infected rats were associated to metabolome changes. Firstly, we quantified the ratio of SCFA involved in gut homeostasis between the end and the beginning of the experiment (D30/D0) <sup>38</sup>. We observed a significant decrease in acetate and propionate D30/D0 ratio in feces from infected rats (**Figure 21A and 21B**), with a trend to a butyrate decrease (**Figure 21C**). Interestingly, the decrease in propionate ratio, significantly correlated with the increase in relative abundance of *Oscillospira* (**Figure 21D**) and the decrease in *Turicibacter* (**Figure 21E**). Moreover, the increase in relative abundance of *Oscillospira* correlated with the decrease acetate ratio (**Figure 21F**). Finally, the trend to butyrate ratio decrease correlated with the decrease in relative abundance of Unclassified *Clostridiaceae* (**Figure 21G**).

Serine protease activity in colon contents of IBS patient is strongly suspected to participate to CHS by activating Protease Activated Receptor-2 (PAR-2) <sup>51-53</sup>. Thus, serine protease activity was evaluated in fecal samples at D30-31 PI. Interestingly, a significant increase in serine protease activity was observed in supernatant from feces of infected rats (**Figure 22A**). This increase in serine protease activity was significantly correlated with the increase in the relative abundance of both *Bacteroides* and Unclassified S24-7 (**Figure 22B and 22C**).

## Discussion

The role of *Blastocystis* spp. as human pathogens remains unclear as it can be found in both symptomatic and asymptomatic patients even though some studies associated *Blastocystis* spp. with acute or chronic digestive disorders <sup>54–60</sup>. In symptomatic patients, blastocystosis is associated with non-specific symptoms such as chronic diarrhea, abdominal pain and bloating, sometime mimicking Irritable Bowel Syndrome (IBS) symptoms <sup>15, 61</sup>. Indeed, individuals suffering from blastocystosis display visceral pain like IBS patients <sup>62, 63</sup>. Interestingly, an increasing number of studies have suggested an association between *Blastocystis* and IBS <sup>26, 28–30</sup>. In all these studies, *Blastocystis* was significantly more present in IBS patients than in control groups. In a recent review we focused on experimental and genomic data supporting this association and suggested interactions between the intestinal microbiota and *Blastocystis* spp., which could be involved in the dysbiosis associated to the IBS <sup>64, 65</sup>. Our results suggest *Blastocystis* infection may lead to IBS-like symptoms. We characterized non-inflammatory Colonic Hyper Sensitivity (CHS) associated to anxiety-and depressive-like behaviors in infected rats. Then, we demonstrated that *Blastocystis* infection was associated to both microbiota and metabolic shifts that may lead to CHS.

The origins of the Colonic Hypersensitivity (CHS) associated to IBS remain elusive. However, CHS occurs in up to 80-90% of IBS patients <sup>66, 67</sup>. The prevalence of IBS may rise 4-31% in patients following acute gastroenteritis (Post Infectious IBS, PI-IBS) with bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., virus or parasites <sup>5</sup>. Then, the epidemiological link between *Blastocystis* spp. and IBS needs to be clarified. Using a

recent model of chronic infection with *Blastocystis* ST4 in rats, our study establishes for the first time the relationship between *Blastocystis* spp. infection and CHS.

In our models, *Blastocystis* chronic infection was associated to CHS. During acute gastroenteritis, immune system is highly activated leading to inflammatory state. After gastroenteritis resolves, inflammation should subside but some study described infiltration of immune cells and high cytokines levels in PI-IBS patients suggesting that establishment of low grade inflammation following gastroenteritis may be a causal factor of CHS<sup>12</sup>. Some *in vitro* studies have shown immunomodulatory effect of *Blastocystis* spp. on mammalian cell cultures. Production of pro-inflammatory cytokines as IL-8, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), IL-1 $\beta$ , IL-6, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in response to *Blastocystis* exposure have been described in epithelial cell line and murine macrophages<sup>15, 68, 69</sup>. Iguchi *et al.*, described also production of pro-inflammatory cytokines in rat model without immune cells infiltration<sup>70</sup>.

Even though both colonic IL-6 and lipocalin-2 proteins, but also GATA-3 mRNA, tended to be higher in our infected animals, we did not observe significant inflammation or tissue perturbations in our study. This could be due to the use of *Blastocystis* ST4 that is considered to be of murine origin, and probably the more adapted to rats. Moreover, the isolate used in our study was purified from stools of an asymptomatic carrier. Interestingly, Hussein *et al.*, reported that severity degrees of pathological changes in rats models were correlated to the intensity of symptoms of patients from which those isolates were collected and to STs of *Blastocystis*, suggesting the existence of some more virulent strains<sup>71</sup>.

Altered intestinal permeability is a key feature of IBS pathophysiology and has been observed in all IBS subtypes<sup>72</sup>. Increased intestinal permeability is related to

abnormal expression of tight junction (TJ) proteins, including a decrease in expression of occludin and ZO-1<sup>2, 73</sup>. Biopsy analyses from blastocystosis suffering patients revealed disturbances of barrier function and permeability<sup>15, 74</sup>. These modifications result probably from multiple factors, but congruent results were reported from some *in vitro* experiments showing capacities of *Blastocystis* factors to interfere with ZO-1 and occludin, leading to TJ dysfunctions<sup>75–78</sup>. In our model, infected animals display a significant decrease in occludin mRNA expression in colon, suggesting that *Blastocystis* infection may be associated to altered intestinal barrier.

Psychological disturbances, especially anxiety and depression, are the most frequent comorbidities associated to visceral pain<sup>48, 49</sup>. In our study, global behavior was analyzed with a novel device, the PhenoTyper®, which allows a continuous and long-term monitoring of animal behaviors. Some behaviors were reported to be associated to specific psychological or physiological changes in rats. Then, a decrease in grooming is positively associated to depressive-like behavior, whereas a decrease in sniffing, related to curiosity or exploration, is positively associated to anxiety-like behavior<sup>79–82</sup>. Moreover, rearing, which is also considered as behavior related to exploration, may be an effective indicator of pain<sup>83</sup>. These three behaviors were significantly modified in our study, and confirmed by both EPM and FST reference tests. Our results suggest that *Blastocystis* infected rats presented both anxiety and depressive-like behaviors, probably linked to visceral pain. Indeed, we highlighted a significant correlation between increase of spent time in open arms (EPM) and CHS severity, reinforcing the role of visceral pain in behavior changes of our models. This complex link between visceral sensitivity and psychological perceptions are mediated



via the brain–gut axis. Central nervous system may be modulated by immune system or microbiota metabolites.

Then, we characterized the microbiota modifications associated to *Blastocystis* ST4 infection in our model. The gut microbiota is regarded as a key player in the pathophysiology of IBS <sup>4</sup>. Some recent studies described either a healthy microbiota associated to *Blastocystis* or dysbiosis <sup>29, 33–35, 37, 84</sup>. Then, this association between *Blastocystis* and microbiota composition still to be clarified, as well as the causality link between microbial communities' changes and *Blastocystis*. Our results show that *Blastocystis* infection in rats is associated to bacterial community switches, confirming for the first time a direct impact of this parasite on microbiota. These changes were characterized by both significant increase in bacterial richness and decrease in *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio. Increased bacterial richness in human intestinal microbiota associated to *Blastocystis* infection has been reported in different clinical studies, and is usually associated to a healthy microbiota <sup>35</sup>. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio is a rough indicator of bacterial population shifts, and both a higher and lower ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* have been described in IBS <sup>50</sup>. Deeper analyses revealed six bacterial genera significantly modified in infected animals. Among them, we observed an increase in relative abundance of *Bacteroides* and a decrease in *Clostridiaceae*, both being correlated with CHS. Our results are therefore in agreement with previous reports describing an increase in *Bacteroides* genus in IBS patients, and the association of that genera with visceral pain <sup>85–87</sup>. Moreover, we observed a decrease in relative abundance of *Peptostreptococcaceae* which may associated with depressive-like behavior as described by Yu *et al.*, <sup>88</sup>.

*Clostridiaceae* and *Turicibacter* also belong to SCFA-producing bacteria <sup>89–91</sup>. SCFAs, including acetate, propionate and butyrate, play an important role in the maintenance of a healthy epithelial barrier, and their decrease has been reported in various diseases such as IBS <sup>38, 87</sup>. In our study, feces composition of infected rats presented with a decrease in the overall content of SCFAs. Three bacteria genera were linked to that decrease with *Clostridiaceae* and *Turicibacter* as discussed above, and *Oscillospira*. Interestingly, a recent study shown a reduction of acetate, propionate and butyrate in *Blastocystis* colonized individuals, associated to an over representation of *Oscillospira* <sup>35</sup>. Origins of CHS in IBS patients have various origins. Altered epithelial barrier is probably one of the most important mechanisms as increase intestinal permeability is suspected to enable diffusion of luminal antigens and/or proteases to submucosa compartment. Then, diffusion of serine-proteases to submucosa may be responsible for an activation of neuronal protease activated receptor (PAR) and nociceptive signal <sup>51</sup>. In our model, we suspected an alteration in intestinal integrity as mRNA occludin expression was strongly decreased. This could be the result of SCFAs decrease. Moreover, serine protease activity was increased in feces from infected rats. Even though *Blastocystis* may produce serine proteases, we thought that fecal serine protease activity mainly originated from microbiota <sup>92</sup>. Then, further experiments are required to evaluate how that intra-luminal increase in serine protease activity contributes to CHS in our model.

To conclude, we were able for the first time to demonstrate that *Blastocystis* establishment within gut microbiota is responsible for bacterial community perturbations associated to metabolic shifts, leading to CHS. Interestingly, some modifications in infected rats were also previously reported in human <sup>34, 35, 84</sup>. Even

though mechanisms of *Blastocystis*-induced CHS still to be understood, these perturbations were sufficient to impact on animal behavior. Regarding our results, blastocystosis symptoms in rats mimic human IBS, raising the question of *Blastocystis* eradication in IBS carriers of this protozoan. Moreover, *Blastocystis* rat model seems to constitute a good model to decipher non-inflammatory CHS.

## Acknowledgements

This work was achieved by obtaining a co-financing Region Auvergne-Rhône-Alpes and FEDER in 2015 (“Thématiques émergentes”). Manon Defaye and Elodie Baudu were supported by grants from the Region Auvergne-Rhône-Alpes.

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm and Université Clermont Auvergne [UMR1107, UMR1071]; INRA [USC-2018]; CNRS [UMR6023].

## References

1. Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B. The Pharmacology of Visceral Pain. In: *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.).Vol 75.; 2016:273–301.
2. Enck P, Aziz Q, Barbara G, et al. Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Prim* 2016;2:16014.
3. Drossman DA. Functional gastrointestinal disorders: what's new for Rome IV? *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2016;1:6–8.
4. Enck P, Mazurak N. Dysbiosis in Functional Bowel Disorders. *Ann Nutr Metab* 2018;72:296–306.
5. Lee YY, Annamalai C, Rao SSC. Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2017;19:56.
6. Spiller R, Garsed K. Postinfectious Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2009;136:1979–1988.
7. Zanini B, Ricci C, Bandera F, et al. Incidence of post-infectious irritable bowel syndrome and functional intestinal disorders following a water-borne viral gastroenteritis outbreak. *Am J Gastroenterol* 2012;107:891–9.
8. Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR, et al. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. *Gastroenterology* 2003;125:1651–9.
9. Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:163–73.
10. Bercík P, Wang L, Verdú EF, et al. Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2004;127:179–87.
11. Parry SD, Stansfield R, Jelley D, et al. Does bacterial gastroenteritis predispose people to functional gastrointestinal disorders? A prospective, community-based, case-control study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1970–5.
12. Downs IA, Aroniadis OC, Kelly L, et al. Postinfection Irritable Bowel Syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2017;51:869–877.
13. Beatty JK, Bhargava A, Buret AG. Post-infectious irritable bowel syndrome: mechanistic insights into chronic disturbances following enteric infection. *World J Gastroenterol* 2014;20:3976–85.
14. Klem F, Wadhwa A, Prokop LJ, et al. Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 2017;152:1042–1054.e1.
15. Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:639–665.

16. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, et al. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop* 2013;126:11–18.
17. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:588–92.
18. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int* 2016;65:763–771.
19. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, 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* 2011;49:975–983.
20. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, et al. 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.
21. Olsen KEP, Christiansen DB, Nielsen HV, et al. *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 2011;84:883–885.
22. Tito RY, Chaffron S, Caenepeel C, et al. Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut* 2018:gutjnl-2018-316106.
23. Katsumata M, Yoshikawa H, Tokoro M, et al. Molecular phylogeny of *Blastocystis* isolates from wild rodents captured in Indonesia and Japan. *Parasitol Res* 2018.
24. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, et al. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol Int* 2016;65:780–784.
25. Safadi D El, Gaayeb L, Meloni D, et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis* 2014;14:164.
26. Yakoob J, Jafri W, Jafri N, et al. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis* hominis. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:383–5.
27. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, et al. *Blastocystis* hominis and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res* 2010;107:679–684.
28. Ragavan ND, Kumar S, Chye TT, et al. *Blastocystis* sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS) - Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy Lo AWI, ed. *PLoS One* 2015;10:e0121173.
29. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, 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.
30. Rostami A, Riahi SM, Haghighi A, et al. Erratum to: the role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res* 2017;116:2611–2612.

31. Beghini F, Pasolli E, Truong TD, et al. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*, a common member of the human gut microbiome. *ISME J* 2017;11:2848–2863.
32. Andersen LO, Bonde I, Nielsen HB, et al. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. Marchesi J, ed. *FEMS Microbiol Ecol* 2015;91:1–9.
33. O'Brien Andersen L, Karim AB, Roager HM, et al. Associations between common intestinal parasites and bacteria in humans as revealed by qPCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:1427–1431.
34. Audebert C, Even G, Cian A, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep* 2016;6:25255.
35. Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Laforest-Lapointe I, et al. Asymptomatic Intestinal Colonization with Protist *Blastocystis* Is Strongly Associated with Distinct Microbiome Ecological Patterns. *mSystems* 2018;3.
36. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 2017;5:153.
37. Forsell J, Bengtsson-Palme J, Angelin M, et al. The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiol* 2017;17:231.
38. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 2016;16:341–352.
39. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.
40. Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis*: Isolation, Xenic Cultivation, and Cryopreservation. In: *Current Protocols in Microbiology*. Vol 43. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016:20A.1.1-20A.1.8.
41. Larauche M, Gourcerol G, Million M, et al. Repeated psychological stress-induced alterations of visceral sensitivity and colonic motor functions in mice: influence of surgery and postoperative single housing on visceromotor responses. *Stress* 2010;13:343–54.
42. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335–336.
43. Edgar RC, Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 2015;31:3476–3482.
44. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26:2460–2461.
45. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abdollahi M, et al. The Role of Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments. *J Neurogastroenterol Motil* 2016;22:558–574.

46. Balemans D, Mondelaers SU, Cibert-Goton V, et al. Evidence for long-term sensitization of the bowel in patients with post-infectious-IBS. *Sci Rep* 2017;7:13606.
47. Kuiken Sd, Lindeboom R, Tytgat Gn, et al. Relationship between symptoms and hypersensitivity to rectal distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:157–164.
48. Fond G, Loundou A, Hamdani N, et al. Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2014;264:651–60.
49. Shah E, Rezaie A, Riddle M, et al. Psychological disorders in gastrointestinal disease: epiphenomenon, cause or consequence? *Ann Gastroenterol* 2014;27:224–230.
50. Rodiño-Janeiro BK, Vicario M, Alonso-Cotoner C, et al. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv Ther* 2018;35:289–310.
51. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007;117:636–647.
52. Steck N, Mueller K, Schemann M, et al. Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* 2012;61:1610–1618.
53. Róka R, Rosztóczy A, Leveque M, et al. A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:550–5.
54. Dogruman-AI F, Simsek Z, Boorum K, et al. Comparison of Methods for Detection of *Blastocystis* Infection in Routinely Submitted Stool Samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey Bereswill S, ed. *PLoS One* 2010;5:e15484.
55. Eroglu F, Genc A, Elgun G, et al. Identification of *Blastocystis* hominis isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res* 2009;105:1589–1592.
56. Nassir E, Awad J, Abel AB, et al. *Blastocystis* hominis as a cause of hypoalbuminemia and anasarca. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:399–402.
57. Rossignol J-F, Kabil SM, Said M, et al. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis* hominis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:987–91.
58. Souppart L, Sancier G, Cian A, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol Res* 2009;105:413–421.
59. Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, et al. Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms: a case–control study. *BMC Gastroenterol* 2012;12:122.
60. Stark D, Hal S van, Marriott D, et al. 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.

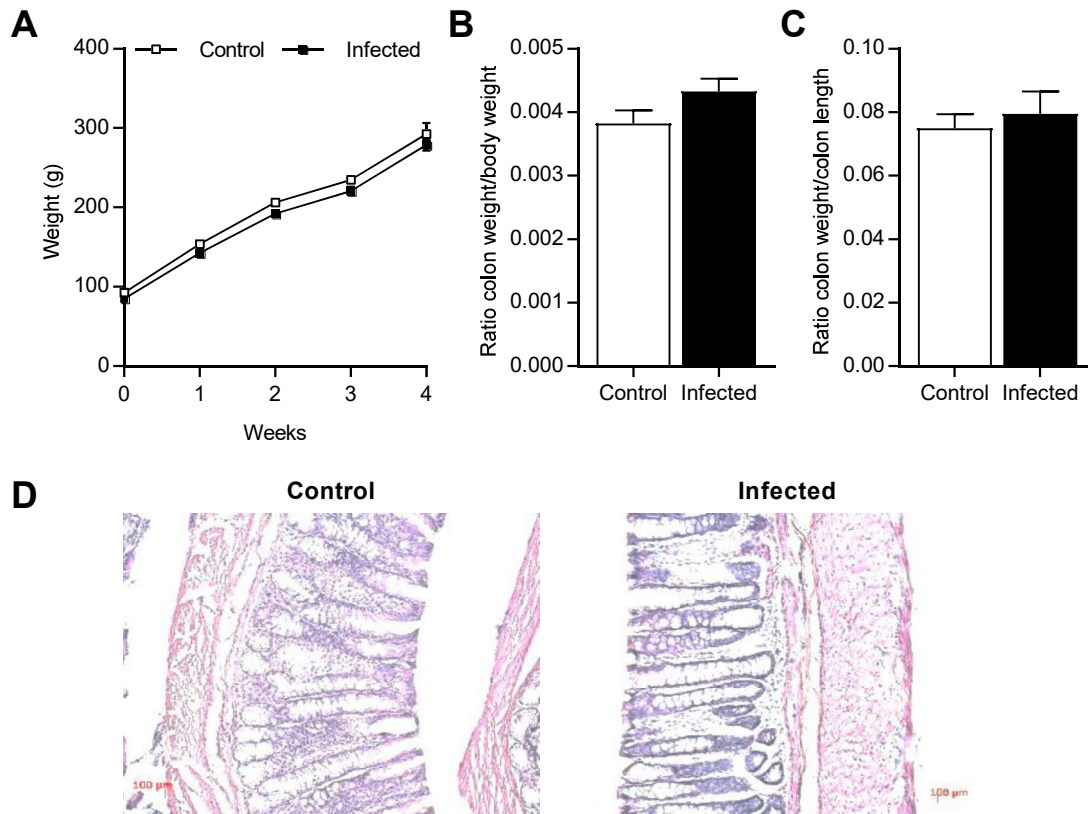
61. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, et al. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Curr Infect Dis Rep* 2010;12:28–35.
62. Toro Monjaraz EM, Vichido Luna MA, Montijo Barrios E, et al. *Blastocystis* Hominis and Chronic Abdominal Pain in Children: Is there an Association between Them? *J Trop Pediatr* 2018;64:279–283.
63. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, et al. Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis* sp. infection in Barcelona, Spain. *Parasit Vectors* 2016;9:548.
64. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, et al. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog* 2012;8:1–4.
65. Lee KJ, Tack J. Altered intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:493–8.
66. Ritchie J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 1973;14:125–32.
67. Mertz H, Naliboff B, Munakata J, et al. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995;109:40–52.
68. Puthia MK, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryot Cell* 2008;7:435–43.
69. Lim MX, Png CW, Tay CYB, et al. Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. Appleton JA, ed. *Infect Immun* 2014;82:4789–801.
70. Iguchi A, Yoshikawa H, Yamada M, et al. 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.
71. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, et al. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* 2008;102:853–860.
72. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:503–512.
73. Martínez C, Lobo B, Pigrau M, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut* 2013;62:1160–8.
74. Dagci H, Kurt Ö, Demirel M, et al. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iran J Parasitol* 9:519–29.
75. Mirza H, Wu Z, Teo JDW, et al. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell Microbiol* 2012;14:1474–1484.



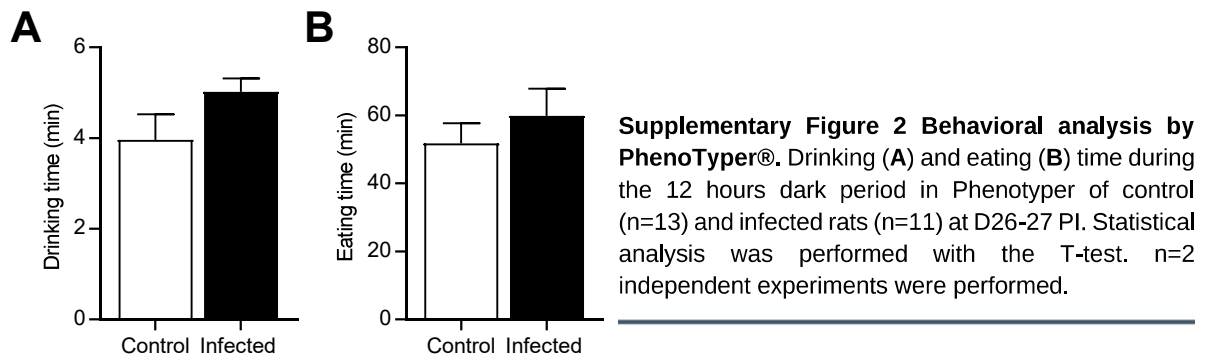
76. Wu Z, Mirza H, Teo JDW, et al. Strain-Dependent Induction of Human Enterocyte Apoptosis by *Blastocystis* Disrupts Epithelial Barrier and ZO-1 Organization in a Caspase 3- and 9-Dependent Manner. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–11.
77. Wu Z, Mirza H, Tan KSW. Intra-Subtype Variation in Enteroadhesion Accounts for Differences in Epithelial Barrier Disruption and Is Associated with Metronidazole Resistance in *Blastocystis* Subtype-7 Gasser RB, ed. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2885.
78. Nourrisson C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology* 2016;143:1713–1722.
79. Rosa PB, Ribeiro CM, Bettio LEB, et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;127:1–6.
80. Moretti M, Colla A, Oliveira Balen G de, et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res* 2012;46:331–40.
81. Garabadu D, Krishnamurthy S. *Asparagus racemosus* Attenuates Anxiety-Like Behavior in Experimental Animal Models. *Cell Mol Neurobiol* 2014;34:511–521.
82. Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2014;42:207–17.
83. Cho H, Jang Y, Lee B, et al. Voluntary movements as a possible non-reflexive pain assay. *Mol Pain* 2013;9:25.
84. Nagel R, Traub RJ, Allcock RJN, et al. Comparison of faecal microbiota in *Blastocystis*-positive and *Blastocystis*-negative irritable bowel syndrome patients. *Microbiome* 2016;4:47.
85. Eutamène H, Garcia-Rodenas CL, Yvon S, et al. Luminal contents from the gut of colicky infants induce visceral hypersensitivity in mice. *Neurogastroenterol Motil* 2017;29:e12994.
86. Aguilera M, Cerdà-Cuéllar M, Martínez V. Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes* 2015;6:10–23.
87. Pozuelo M, Panda S, Santiago A, et al. Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci Rep* 2015;5:12693.
88. Yu M, Jia H, Zhou C, et al. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *J Pharm Biomed Anal* 2017;138:231–239.
89. Zhong Y, Nyman M, Fåk F. Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. *Mol Nutr Food Res* 2015;59:2066–76.

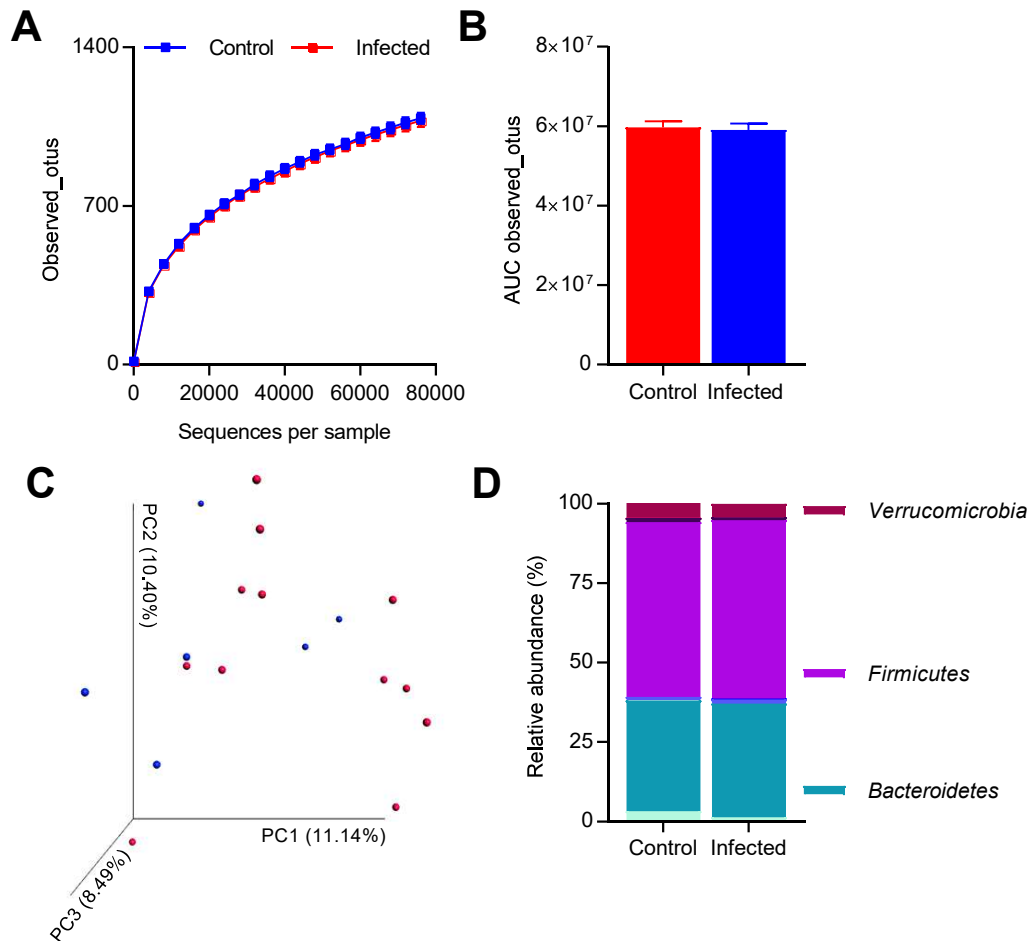
90. Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, et al. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Sci Rep* 2017;7:15876.
91. Hugenholtz F, Davids M, Schwarz J, et al. Metatranscriptome analysis of the microbial fermentation of dietary milk proteins in the murine gut. *PLoS One* 2018;13:e0194066.
92. Denoeud F, Roussel M, Noel B, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol* 2011;12:R29.

## Supplementary figures



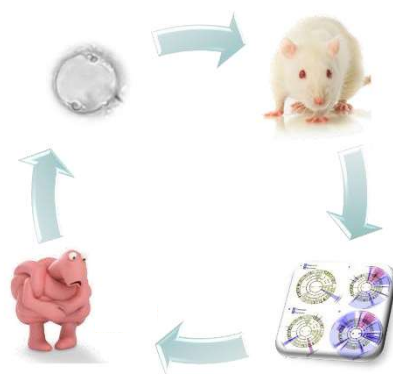
**Supplementary Figure 1 : Evaluation of anatomical parameters.** (A) Body weight of control (n= 6) and infected rats (n=12) monitoring from D0 to D30-31 PI. (B) Colon weight/body weight ratio of control (n=4) and infected rats (n=6) at D30-31 PI. (C) Colon weight/length ratio of control (n=4) and infected rats (n=6) at D30-31 PI. (D) Representative colonic tissue sections, of control and infected rats at D30-31 PI. Statistical analysis: **A**, Two-way ANOVA test followed by a Sidak post-hoc test; **B**, T-test; **C**, Mann-Whitney test; \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001; n=3 to 4 independent experiments were performed.





**Supplementary Figure 3: Fecal microbiota composition analysis at D0.** (A) Alpha diversity was determined by observed OTUs measurement according to sequences per sample in feces of control (n=6) and infected rats (n=12) at D0 (before infection). Statistical analysis was performed with the Two-way ANOVA test followed by a Sidak post-hoc test. (B) The area under the curve (AUC) of the observed OTUs for control and infected rats. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test. (C) Principal coordinates analysis (PCoA) of the unweighted UniFrac distance of control (n=6, red plots) and infected rats (n=12, blue plots) at D0 (before infection). Significance (p value= 0.109) and the strength of explained variation ( $R^2= 0.06854$ ) were assessed with Adonis. (D) Relative abundance (as a percentage) of phyla in control (n=6) and infected rats (n=12) at D0 (before infection). Statistical analysis was performed with the Two-way ANOVA test followed by a Sidak post-hoc test.

## Partie C : Discussion et perspectives



Les douleurs abdominales chroniques, souvent associées à une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), font partie des symptômes majeurs constatés au cours du SII. L'étiologie multifactorielle de cette pathologie rend la physiopathologie complexe. Les gastroentérites d'origine infectieuse ont été décrites comme l'un des facteurs de risque dans le développement du SII-post-infectieux (SII-PI). Le SII-PI survient dans 4 à 31% des cas suite à une gastroentérite aiguë d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. Ses infections peuvent avoir, à court et à long terme, de nombreuses répercussions notamment sur l'intégrité de la barrière intestinale, l'activation du système immunitaire et/ou le microbiote intestinal.

*Blastocystis* est le parasite intestinal le plus fréquemment rencontré chez l'Homme. Néanmoins, malgré de récentes études épidémiologiques rapportant une plus forte prévalence de ce parasite chez les patients atteints du SII, son rôle en santé humaine est largement controversé. De plus, plusieurs études rapportent que les individus porteurs de ce parasite présentent des douleurs abdominales et sont atteints d'une dysbiose intestinale. L'absence d'un modèle animal d'infection par *Blastocystis* standardisé ne permet pas à l'heure actuelle de décrire et de comprendre les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection par ce parasite.

---

### Mise en place d'un modèle d'infection chronique par *Blastocystis* chez le rat

---

L'article 1 fut consacré à la mise en place d'un modèle murin d'infection par *Blastocystis*. Les modèles animaux sont essentiels pour une meilleure compréhension de la pathogénicité de *Blastocystis* qui reste controversée à ce jour. Différentes espèces animales ont été décrites comme sensibles à l'infection: le rat (le plus fréquemment utilisé), la souris, le cobaye et le poulet (Ajjampur et Tan, 2016). Cependant, il n'existe pas à ce jour aucun modèle d'infection standardisé ce qui suggère que l'établissement de ce modèle *in vivo* est difficile et peu reproductible. Dans cette étude, nous avons donc cherché à mettre en place un protocole efficace et reproductible pour obtenir une infection chronique par *Blastocystis*. En se basant sur les données de la littérature, nous nous sommes concentrés sur un modèle rongeur avec l'utilisation de rats et de souris. Par ailleurs, quatre STs humains différents ont été utilisés : le ST3, le ST le plus prévalent chez l'Homme, suivi par le ST2 et le ST4 (très répandu en Europe

et communément retrouvé chez le rongeur) ainsi que le ST7 dont le génome entier fut le premier séquencé (Denoeud *et al.*, 2011; Domínguez-Márquez *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2011; Poirier *et al.*, 2011; Wawrzyniak *et al.*, 2008). Les différents STs étaient issus de selles humaines ou de culture axénique (ST4 WR1 isolé d'un rat de laboratoire) (Chen *et al.*, 1997).

L'utilisation de cultures axéniques de ST4 WR1 (composées essentiellement de formes vacuolaires) pour l'infection n'a pas été très concluante et ceci malgré les différentes méthodes d'inoculation utilisées. Nous avons alors émis l'hypothèse que les nombreux passages en culture et/ou que l'axénisation pouvaient avoir atténué le potentiel infectieux de cette souche. En effet, la modulation de la virulence suite aux nombreux passages en culture a été décrite pour d'autres parasites et notamment *Entamoeba histolytica* et *Trypanosoma cruzi* (Contreras *et al.*, 1998; Olivos *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2016). Néanmoins, l'utilisation de formes vacuolaires de ST7 issus de selles humaines n'a pas permis d'infecter les rats confortant notre deuxième hypothèse qui est que seule la forme kystique est la forme infectieuse. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que certaines souches axéniques puissent conserver leur potentiel infectieux ou produire des kystes dans certaines conditions de culture.

Le kyste est considéré comme la seule forme infectieuse du parasite et donc à l'origine de la contamination féco-orale (Iguchi *et al.*, 2007; Suresh *et al.*, 1993; Yoshikawa *et al.*, 2004). Des travaux expérimentaux ont été réalisés au laboratoire pour favoriser l'enkystement *in vitro* de la souche ST4 WR1 que nous maintenons en culture axénique. Différents protocoles étaient à disposition dans la littérature notamment celui de Suresh *et al.*, dont nous nous sommes inspirés (Suresh *et al.*, 1993). Suite à l'utilisation de différents milieux de culture, des formes semblables à des kystes ont été observées en culture. Cependant, aucune de ces formes n'a conduit à une infection chez le rat. De ce fait, la seule option a été d'isoler des kystes de patients et d'éliminer les bactéries associées afin de pouvoir conclure sur la réelle implication de *Blastocystis* dans certains effets biologiques observés. Nous avons alors optimisés un protocole de purification décrit précédemment par Yoshikawa *et al.*, notamment par l'ajout d'un deuxième gradient de percoll et d'un traitement antibiotique à spectre large ciblant les bactéries aérobies et anaérobies (Yoshikawa *et al.*, 2004). Ce protocole nous a permis d'isoler des kystes et de réduire de façon drastique le nombre de bactéries dans l'inoculum. En effet, moins de 250 CFU, cultivable sur gélose LB en condition aérobie et anaérobie, ont été apportés à chaque rat.

L'utilisation de ce protocole nous a permis d'infecter de manière chronique (plus de 8 semaines) les rats avec le ST2, ST3, ST4 à forte concentration ( $10^5$ ). Il faut noter que certains



rats ont été suivis pendant plusieurs mois et que ceux-ci produisaient des kystes jusqu'à leur euthanasie confirmant la présence d'une infection chronique. Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure sur une réelle implantation du parasite ou des réinfections successives par la coprophagie. Une étude très récente a montré qu'à partir d'une année après l'infection initiale les rats n'excrétaient plus de kystes et donc qu'ils n'étaient plus infectés (Růžková *et al.*, 2018). Néanmoins, dans le cas d'une réinfection perpétuelle par la coprophagie ou dans le cas d'une implantation du parasite, il est surprenant que dans cette étude les animaux ne soient plus infectés à partir du 12 ou 13<sup>ème</sup> mois post-infection. L'utilisation de cages métaboliques pourrait nous aider à mieux comprendre la persistance de l'infection. Selon Moe *et al.*, la sensibilité des animaux à l'infection serait dépendante de l'âge des animaux et donc potentiellement de la maturité du système immunitaire (Moe *et al.*, 1997). Dans notre étude, nous avons réussi à infecter des rats juvéniles mais également des rats adultes avec le ST4 suggérant, que pour ce ST, l'âge n'est pas un facteur limitant. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude avec le ST1 (Růžková *et al.*, 2018). Des investigations complémentaires sont nécessaires pour le ST2 et le ST3. De plus, une faible concentration de kystes de ST4 (100 kystes) est suffisante pour infecter les rats alors que la dose minimale pour le ST3 est de  $10^5$  kystes suggérant une spécificité d'hôtes. Les travaux expérimentaux de co-hébergement et d'inoculation orale entre rats ont confirmé notre hypothèse. Ces résultats peuvent alors expliquer pourquoi le ST4 est plus répandu chez le rongeur (Yoshikawa *et al.*, 2016). Ces expérimentations sont à reproduire également avec le ST2. De plus, l'inoculation avec une quantité inférieure à 100 kystes reste à étudier pour évaluer la quantité minimale nécessaire à l'infection. Néanmoins, des travaux antérieurs ont montré que l'efficacité d'infection avec 10 kystes de deux souches de ST4 était extrêmement variable (20 à 100% d'efficacité) (Yoshikawa *et al.*, 2004).

Notre protocole d'infection a été ensuite appliqué à des souris de trois fonds génétiques différents: des souris BALB/c qui sont fréquemment utilisées pour les infections par *Blastocystis* (Ajjampur et Tan, 2016), des souris C3H décrites pour être sensibles à l'infection par d'autres protozoaires intestinaux tels que *Entamoeba histolytica* (Ivory *et al.*, 2007) et des souris C57BL/6 qui correspondent au fond génétique le plus couramment utilisé pour les souris transgéniques et donc qui pourrait être un outil intéressant pour la suite de nos études. Néanmoins, nous n'avons pas été en mesure d'infecter les souris quel que soit leur fond génétique et cela malgré une forte concentration en kystes ( $10^5$ ). On peut donc émettre plusieurs hypothèses concernant la résistance des souris à l'infection par ce parasite. Elle peut s'expliquer par : (i) le système immunitaire, (ii) la barrière intestinale et/ou (iii) le microbiote intestinal. L'utilisation de souris

immunodéficientes (SCID, RAG<sub>2</sub><sup>-/-</sup>), d'émulsifiants alimentaires pour altérer la couche de mucus (Chassaing *et al.*, 2015) ou l'utilisation de souris axéniques ou conventionnelles traitées aux antibiotiques pour « éliminer » le microbiote, permettraient de répondre à chacune de ces hypothèses respectivement. Une récente étude suggère que la couche de mucus serait impliquée dans la résistance. En effet, un traitement au DSS chez la souris augmente leur sensibilité à l'infection par le ST7 au moins pendant 3 jours après une injection intracaecale (Ajjampur *et al.*, 2016). Néanmoins le DSS altère le mucus mais également la barrière épithéliale, il est donc difficile de conclure sur l'importance seule du mucus dans la résistance des souris à l'infection.

Les marquages par immunofluorescence ont révélé que le ST3 et le ST4 étaient présents tout au long du tractus digestif (de la fin de l'estomac jusqu'au rectum) des rats infectés comme cela a été décrit dans la littérature (Fayer *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2005). Les parasites sont retrouvés en grande majorité dans la lumière intestinale mais également au contact des cellules épithéliales. Les images en microscopie électronique ont montré que ces parasites s'apparentaient à des formes vacuolaires présentant des vacuoles denses ou vides comme décrit précédemment par Tan (Tan, 2008) et qu'il existait une interaction physique entre le parasite et les entérocytes. Néanmoins, certaines études ont décrit un envahissement de la muqueuse par *Blastocystis*, or dans notre étude nous n'avons pas observé de parasites dans la *lamina propria*.

Les expériences de TMF ont mis en évidence la capacité de *Blastocystis* à infecter un nouvel hôte sans altération du microbiote au préalable. Nous avons également démontré que la procédure de cryoconservation utilisée en clinique pour la conservation des selles avant la TMF permet de garder le parasite viable et d'infecter un nouvel hôte (Cammarota *et al.*, 2017). Ces données corroborent les récentes recommandations concernant le dépistage des donneurs de selles dans le cadre d'une TMF en confirmant la capacité de transmission de *Blastocystis* via les selles (Cammarota *et al.*, 2017).

En conclusion, notre travail a permis de fournir un protocole d'infection chez le rat permettant d'établir une infection chronique et reproductible. Ce modèle est d'autant plus important qu'il nous a permis par la suite de décrypter les interactions entre l'hôte, le parasite et le microbiote, et d'apporter de nouvelles données quant à sa relevance en santé humaine.

---

## Infection par *Blastocystis*: Modèle de SII d'origine infectieuse

---

Comme dit précédemment le SII-PI survient dans 4 à 31% des cas après une gastroentérite aigüe (Lee *et al.*, 2017b). A noter que suite à une infection parasitaire 40% des patients développent un SII-PI (Klem *et al.*, 2017). Ces dernières années plusieurs études rapportent une plus forte prévalence de *Blastocystis* chez les patients atteints de SII suggérant une contribution de ce parasite dans le développement des symptômes (Nourrisson *et al.*, 2014; Rostami *et al.*, 2017). Ce travail nous a permis de caractériser les perturbations de l'homéostasie intestinale, du microbiote intestinal ainsi que les répercussions sur le comportement en cas d'infection par *Blastocystis*.

Les douleurs chroniques abdominales sont associées dans 80 à 90% des cas à de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) (Mertz *et al.*, 1995; Ritchie, 1973). Par ailleurs, les individus porteurs de *Blastocystis* peuvent présenter des douleurs abdominales (Salvador *et al.*, 2016; Toro Monjaraz *et al.*, 2018). Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'infection par *Blastocystis* ST4 entraîne une HSVC 30 à 31 jours après l'infection. Différents mécanismes peuvent être impliqués dans le développement de l'HSVC tels que l'altération de la barrière intestinale associée à une activation du système immunitaire ou encore le déséquilibre du microbiote intestinal.

### ● *Le système immunitaire*

Lors d'une gastroentérite aigüe, le système immunitaire est fortement activé conduisant à un état inflammatoire important. Suite à cette phase aigüe, l'inflammation peut être résolue ou dans certains cas perdurer. Des études ont montré une infiltration de cellules immunitaires dans les biopsies de patients atteints de SII-PI ainsi qu'une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires dans leur sérum suggérant que l'établissement d'une inflammation de bas grade suite à une gastroentérite infectieuse contribuerait au développement d'une HSVC (Downs *et al.*, 2017). Par ailleurs, *Blastocystis* possède des effets immunomodulateurs. En effet, la production de cytokines pro-inflammatoires, par des cellules épithéliales ou des monocytes en

culture, a été décrite suite à la co-incubation avec des lysats ou des surnageants du parasite (Lim *et al.*, 2014; Puthia *et al.*, 2008; Tan, 2008). De plus, Iguchi *et al.*, ont également montré la production de cytokines pro-inflammatoires chez l'animal suite à l'infection (Iguchi *et al.*, 2009). Nous avons alors évalué l'état inflammatoire de nos animaux 30 à 31 jours après l'infection. La production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$  et lipocaline-2) aux niveaux sérique et colique n'est pas modifiée entre les animaux contrôles et ceux infectés par le ST4. L'analyse histologique des sections de colon n'a également pas montré d'infiltration de cellules immunitaires dans la muqueuse colique. A noter qu'une inflammation modérée à sévère n'a été observée chez le rat que dans le cas d'infection par des isolats de patients symptomatiques, ce qui suggère l'existence de souches plus virulentes que d'autres pouvant expliquer l'absence d'inflammation dans notre modèle (Hussein *et al.*, 2008).

Par la suite nous avons voulu caractériser le type de réponse immunitaire mise en jeu dans le cadre d'une l'infection par *Blastocystis*. Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que l'infection par *Blastocystis* faisait intervenir une réponse de type Th2. En effet, une réponse Th2 est généralement associée à une réponse antiparasitaire et notamment dirigée contre les helminthiases. Elle se caractérise par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes T CD4+ exprimant le facteur de transcription GATA-3. Par ailleurs, cette réponse Th2 fait intervenir les mastocytes qui jouent un rôle dans la physiopathologie du SII. En effet, plusieurs études rapportent une augmentation du nombre de mastocytes et de leur activité ainsi qu'une proximité importante avec les FAP chez les patients atteints de SII (Barbara *et al.*, 2004, 2007). De plus, les métabolites sécrétés par ces cellules tels que l'histamine ou la tryptase ont été décrits comme des facteurs impliqués dans l'HSVC chez ces patients. Dans notre modèle, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation significative de l'expression du gène codant le facteur de transcription GATA-3. Néanmoins, une caractérisation plus poussée, par le dosage de cytokines ou la quantification du nombre de mastocytes, est nécessaire afin de réellement conclure sur l'absence d'une réponse Th2. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure que l'infection par *Blastocystis* puisse induire une réponse de type Th1 ou Th17 comme ce qui a pu être déjà décrit dans le cadre d'infection par d'autres protozoaires intestinaux tels que *Entamoeba histolytica* ou *Giardia duodenalis* (Babaei *et al.*, 2016; Dreesen *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2014; Nakada-Tsukui et Nozaki, 2016).

L'infection par *Blastocystis* s'accompagne également d'une diminution des taux d'IgA dans les selles d'individus porteurs (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). Les études réalisées *in vitro* ont corroboré ces études cliniques (Puthia *et al.*, 2005). Ainsi, des investigations complémentaires sont nécessaires pour évaluer si les IgA sont dégradées dans notre modèle d'HSVC.

#### ● Barrière épithéliale

Des altérations de la perméabilité intestinale ont été observées dans tous les sous-types de SII (Camilleri *et al.*, 2012a). Ces altérations ont été associées à des modifications de la localisation et de l'expression des gènes codant les protéines des jonctions serrées notamment à la diminution de l'expression des occludines et de ZO-1 (Enck *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2013). De plus, les analyses réalisées à partir de biopsies provenant de patients symptomatiques porteurs de *Blastocystis* ont montré des modifications de la perméabilité intestinale (Dagci *et al.*, ; Tan, 2008a). Ces résultats ont été par la suite confirmés *in vitro* montrant que *Blastocystis* entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale avec une modulation de l'expression de ZO-1 et des occludines (Mirza *et al.*, 2012; Nourrisson *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014b, 2014a). Dans notre étude, seule l'expression relative de l'occludine est significativement diminuée 30 jours après l'infection. Nous avons également évalué la perméabilité intestinale *in vivo* en amont de la distension au jour 21 après administration orale de Dextran FITC 4kDa (**Figure 23**). La quantité de FITC Dextran dosée dans le sérum des animaux n'est pas modifiée entre nos deux groupes. Ces résultats « contradictoires » doivent être confirmés par le dosage du FITC Dextran dans le sérum à j30-31. Par ailleurs, nous nous sommes concentrés sur l'expression des gènes codant des protéines de jonctions serrées. La localisation des protéines des jonctions serrées est à réaliser.

La couche de mucus est un autre composant majeur de la barrière intestinale. *Blastocystis* produit de nombreuses protéases et notamment des protéases à cystéine pouvant dégrader la mucine composant le mucus (Denoeud *et al.*, 2011). En effet, ces enzymes pourraient permettre au parasite d'utiliser le mucus comme source de protéines et de glucides pour favoriser son implantation. Iguchi *et al.*, ont montré l'augmentation de la quantité de mucine neutre dans les cellules caliciformes des rats infectés par *Blastocystis* (Iguchi *et al.*, 2009). Des travaux sont en cours de réalisation au laboratoire par le Dr. Céline Nourrisson pour étudier l'impact de l'infection sur le mucus intestinal.

Les données cliniques montrent que *Blastocystis* est retrouvé aussi bien chez les patients atteints de SII-C et que ceux atteints de SII-D (Nourrisson *et al.*, 2014; Yakoob *et al.*, 2010). Les résultats obtenus suggèrent une altération de la barrière épithéliale chez les rats infectés, cependant aucune donnée n'est disponible sur le transit des animaux en cas d'infection et nous n'avons pas observé de modifications de la consistance des fèces. Des tests complémentaires au rouge carmin ou l'utilisation de billes introduites dans le rectum des animaux pourraient apporter de nouvelles informations quant à la modulation du transit.

### ● Comportement

L'axe cerveau-intestin-microbiote permet une communication bidirectionnelle entre le système nerveux central et l'environnement colique. De ce fait, les perturbations de l'un entraînent des répercussions sur l'autre. La transmission des informations est complexe et fait intervenir différentes voies : voie nerveuse, voie endocrine, voie immunitaire et voie métabolique. Dans ce contexte, des comorbidités telles que l'anxiété et la dépression sont fréquemment associées aux douleurs abdominales (Fond *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2014). Dans le cadre de ma thèse, le laboratoire s'est équipé d'un nouveau système de vidéo *tracking* (Phenotyper<sup>®</sup> de la société Noldus) qui permet une analyse globale du comportement de l'animal. Dans un premier temps, nous n'avons pas mis en évidence de perturbations de la locomotion chez nos animaux infectés. Cependant, la fréquence de toilettage ainsi que les comportements relatifs à l'exploration de l'animal (*Sniffing* et *Rearing*) sont réduits chez les animaux infectés. Ces trois comportements peuvent traduire un comportement anxio-dépressif chez l'animal. En effet, la diminution de la fréquence de toilettage a été associée positivement à de la dépression (Moretti *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2014). De plus, les comportements dit d'explorations ont été corrélés à de l'anxiété (Crumevolle-Arias *et al.*, 2014; Garabadu et Krishnamurthy, 2014). Il faut noter également que le redressement des animaux peut être également un indicateur de douleur (Cho *et al.*, 2013). Par la suite nous avons confirmé nos hypothèses par l'utilisation de tests permettant de mesurer l'anxiété (EPM) et la dépression (FST) chez l'animal. De manière intéressante le comportement anxieux a été corrélé à l'HSVC. Ces résultats suggèrent donc une altération de l'axe cerveau-intestin-microbiote chez les rats infectés. Les données obtenues pour les concentrations d'AGCC fécaux nous ont permis d'émettre différentes hypothèses (voir la partie microbiote intestinal).

Un déficit de la mémoire spatio-visuelle a été caractérisé chez les patients SII (Kennedy *et al.*, 2014a). Dans cette étude, la mémorisation des animaux n'a été pas évaluée. En complément des analyses de la composante émotionnelle, la caractérisation de la composante cognitive (test du labyrinthe en Y par exemple) devra être réalisée par la suite.

#### ● *Microbiome intestinal*

Il est maintenant admis que le microbiome intestinal est un acteur clé dans la physiopathologie du SII (Enck et Mazurak, 2018a). De plus, de récentes études ont montré que les individus porteurs de *Blastocystis* présentaient une dysbiose intestinale (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018; Nourrisson *et al.*, 2014; O'Brien Andersen *et al.*, 2016). Nos résultats corroborent les résultats obtenus en clinique puisqu'une dysbiose intestinale à j30-31 a été caractérisée chez les animaux infectés. Cette dysbiose se caractérise par une augmentation de la richesse bactérienne et d'une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Il faut noter que moins de 250 CFU ont été administrés à chaque rat et l'analyse du séquençage de l'inoculum a révélé 63% de *Firmicutes* ce qui n'explique donc pas l'augmentation des *Bacteroidetes* chez les animaux infectés. L'augmentation de la richesse bactérienne est souvent associée, à tort, à un bénéfice pour l'organisme, cependant, les infections parasitaires (*Ascaris* par exemple) sont généralement associées à une augmentation de la richesse bactérienne (Lee *et al.*, 2014b). Par ailleurs, la modification du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* est un bon indicateur d'une dysbiose. Son augmentation ou sa diminution a été rapportée chez le SII (Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018). Par la suite, l'analyse taxonomique a révélé la modification de l'abondance relative de six genres bactériens lors de l'infection. L'augmentation de l'abondance relative du genre *Bacteroides* a été corrélée à l'HSVC. Dans la littérature, l'abondance relative augmentée du genre *Bacteroides* a été décrite chez les patients atteints de SII (Pozuelo *et al.*, 2015). De plus ce genre bactérien a été associé à l'HSVC (Aguilera *et al.*, 2015; Eutamène *et al.*, 2017). En parallèle, la diminution de l'abondance relative des Unclassified *Clostridiaceae*, bactéries productrices d'AGCC, a été corrélée à l'HSVC. Récemment, une étude a montré que les taux d'AGCC étaient diminués chez les individus porteurs de *Blastocystis* (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). Comme décrit en clinique, nous avons retrouvé une diminution significative des quantités d'acétate et de propionate et une tendance pour le butyrate dans les fèces des animaux infectés. La diminution des quantités d'AGCC fécaux a été corrélée à différents genres bactériens et notamment à l'augmentation de l'abondance relative du genre *Oscillospira* corroborant les résultats décrits

chez les porteurs du parasite (Nieves-Ramírez *et al.*, 2018). Les AGCC sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale mais également dans la voie de communication de l'axe intestin-cerveau (Rooks et Garrett, 2016a). Dans ce contexte on peut imaginer que la réduction des taux d'AGCC fécaux peut, d'une part, conduire à l'altération de la barrière épithéliale et donc expliquer la réduction de l'expression des occludines et, d'autre part, avoir des répercussions au niveau central et notamment sur le comportement anxio-dépressif. En effet, le butyrate possède des effets antidépresseurs *via* l'inhibition des histones désacétylases. Lorsque du sodium butyrate est injecté dans la circulation sanguine, une acétylation transitoire des histones est observée dans le cortex frontal et l'hippocampe en association avec une augmentation de l'expression de BDNF, dont le lien avec la dépression a été montré (Schroeder *et al.*, 2007). Dans ce contexte, l'administration d'AGCC ou de bactéries productrices d'AGCC (*Feacalibacterium prausnitzii*) chez les rats infectés pourrait alors réduire d'une part l'HSVC par la restauration de la barrière épithéliale mais également réduire le comportement anxio-dépressif.

De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de l'activité protéasique chez les patients SII et notamment des protéases à sérine qui peuvent conduire au développement d'une HSVC (Cenac *et al.*, 2007). Les études réalisées au laboratoire ont également montré que *Blastocystis* peut produire des protéases à sérine suggérant leur implication dans l'HSVC. Nous avons observé une augmentation de l'activité des protéases à sérine dans les fèces des animaux infectés. Cette augmentation a été corrélée, d'une part, au genre des *Bacteroides* et, d'autre part, à la famille des *S24-7* suggérant l'implication également du microbiote intestinal dans l'activité de ces protéases. Les protéases à sérine sont capables de cliver les récepteurs PAR exprimés sur les FAP conduisant à la mise en place d'un message douloureux. Ainsi, nous avons analysé l'expression de ces récepteurs au niveau colique (**Figure 24A**). Nous n'avons pas observé de modifications de l'expression des PAR-2 entre les deux groupes. Néanmoins, ces récepteurs sont exprimés au niveau de FAP mais également sur un grand nombre de cellules telles que les entérocytes ou les cellules immunitaires. Une compartimentation est donc nécessaire afin d'évaluer leur expression sur les différents types cellulaires.

Suite à nos observations, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de l'activité des protéases à sérine pouvait conduire au développement d'une HSVC chez les animaux infectés. Afin d'évaluer l'implication des sérines protéases dans l'activation des FAP conduisant à une



HSVC, des expérimentations d'imagerie calcique sur des neurones de ganglions spinaux (DRG) sont actuellement en cours au laboratoire. Les surnageants de fèces de rats contrôles (SN CTRL) et infectés (SN INF) sont perfusés sur les neurones en culture qui ont été préalablement incubés avec du FURA-2 (sonde fluorescente capable de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire libre). Lorsque les neurones sont activés, la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  augmente et on observe une augmentation de la fluorescence. Les résultats préliminaires montrent une augmentation du nombre de neurones répondant aux SN INF en comparaison aux SN CTRL. Pour évaluer l'implication des protéases à sérine dans cette activation, un inhibiteur de protéases sera utilisé afin d'inhiber l'activation neuronale.

Le FUT-175, un inhibiteur de protéases décrit dans la littérature (Cenac *et al.*, 2007), a été également utilisé *in vivo* de manière aigüe afin de réduire l'activité des sérines protéases et de voir si nous pouvions réduire l'HSVC. Pour cela, nous avons évalué la sensibilité des animaux 4 semaines PI, puis nous avons injecté le FUT-175 à 10mg/kg en sous-cutanée et nous avons réalisé à nouveau trois rampes de distension pour les plus fortes pressions à 30, 60 et 120 minutes post-injection. Nous n'avons pas observé de réduction de la sensibilité des animaux, en revanche, une sensibilisation des animaux contrôles ou infectés a été observée (**Figure 24B**). Ces résultats préliminaires amènent de nouvelles questions. En effet, l'injection en sous-cutanée permet-elle d'inhiber les protéases à sérine présentes dans la lumière colique ? Est-ce qu'une administration aigüe suffit-elle à réduire l'HSVC ? De nouvelles investigations sont donc nécessaires afin d'évaluer si la voie d'administration ainsi que la chronicité du traitement peuvent réduire l'HSVC en cas d'infection par *Blastocystis*. Par ailleurs, nous n'avons pas encore déterminé la provenance des protéases à sérine. Celles-ci peuvent être produites par l'hôte, le parasite mais également le microbiote intestinal. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour répondre à cette question.

Tous nos résultats suggèrent une implication importante du microbiote intestinal dans le développement d'une HSVC chez les animaux infectés par *Blastocystis* ST4. Afin d'évaluer son rôle, des expérimentations de TMF ont été réalisées. Les fèces des rats contrôles et hypersensibles (et donc infectés) ont été collectées à j30-31 et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . En parallèle, des rats conventionnels ont été traités durant 5 jours avec un cocktail d'antibiotiques 1X, administré *via* l'eau de boisson, composé de vancomycine (0,5mg/ml), amoxicilline-clavulanate (1mg/ml), céfotaxime (1mg/ml), cloxacilline (1mg/ml). Un gavage quotidien a été réalisé avec un cocktail à 3X en présence de métronidazole (10mg/ml). Chaque jour les fèces des rats traités

aux antibiotiques ont été collectées et étalées sur gélose LB afin d'évaluer la déplétion du microbiote intestinal. Après arrêt du traitement à j5, les rats ont été mis pendant 24 heures sous Movicol (laxatif osmotique) afin d'éliminer les bactéries mortes présentes dans le tractus digestif. A j6, les rats ont reçu le pool de fèces de rats contrôles (FMT CTRL) ou le pool de fèces de rats hypersensibles (FMT HS). Chaque semaine les fèces des rats ont été récoltées pour vérifier l'absence de colonisation des rats par le parasite afin de pouvoir conclure sur l'impact de la dysbiose bactérienne dans l'HSVC. Les animaux n'étant pas infectés, le test de distension colorectale a été réalisé à 2, 4 et 6 semaines post-inoculation. Les résultats montrés sont ceux obtenus à 4 semaines, à noter que le même type de réponse a été obtenu pour les deux autres temps. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence que le microbiote intestinal de rats infectés conduit au développement d'une HSVC après transfert (**Figure 25**). De manière intéressante, la réponse des rats traités contrôles (FMT CTRL) est élevée en comparaison à des rats conventionnels contrôles suggérant que le traitement antibiotique a lui-même augmenté la sensibilité colique des animaux (Aguilera *et al.*, 2015). Ainsi, les différences de sensibilité entre les deux groupes pourraient avoir été atténuées par le traitement antibiotique. L'utilisation d'animaux axéniques pourrait permettre de s'affranchir des effets des antibiotiques. Néanmoins, les animaux axéniques présentent des inconvénients puisqu'il est maintenant bien caractérisé que le système nerveux entérique ainsi que le système immunitaire de ces animaux ne sont pas matures (Collins *et al.*, 2014; Hooper *et al.*, 2012; De Vadder *et al.*, 2018). On ne peut également pas exclure que le moyen de conservation des fèces n'a pas permis de préserver tous les genres bactériens et donc que les bactéries impliquées dans l'HSVC n'ont pas été transférées. Des analyses par qPCR ciblant ces groupes bactériens nous permettraient de répondre à cette hypothèse. Par ailleurs, lorsqu'on regarde les recommandations européennes pour la TMF, l'utilisation de glycérol 10% pour la conservation des selles est recommandée (Cammarota *et al.*, 2017). Ainsi, la même expérience a été réalisée avec des fèces qui ont été conservées dans du glycérol 10%. Cependant, le glycérol 10% a permis de conserver la viabilité du parasite et donc son implantation après transfert. Ainsi nous n'avons pas pu conclure sur l'implication de la dysbiose intestinale suite à l'infection par *Blastocystis* dans la genèse de l'HSVC.

Une autre possibilité pour répondre à cette hypothèse serait l'utilisation de souris. En effet, les expériences que nous avons menées montrent que la souris semble résistante à l'infection par *Blastocystis*. Le transfert de microbiote fécal (conservation dans le glycérol 10%) de rats contrôles ou de rats infectés chez des souris axéniques ou traitées aux antibiotiques permettrait d'évaluer si le microbiote est responsable de l'HSVC. Néanmoins, le risque du transfert de microbiote, d'une espèce à une autre, est que le microbiote de l'espèce receveuse soit dominant sur le microbiote de l'espèce donneuse.

Dans un premier temps nous avons voulu transférer l'HSVC d'un rat à un autre *via* le microbiote. Nous pouvons envisager également d'utiliser la TMF afin de réduire l'HSVC. En effet, après infection et donc induction de l'HSVC chez le rat, nous pourrions transférer la flore de départ de chaque rat afin de réduire les symptômes. L'utilisation d'un traitement antibiotique serait alors nécessaire afin d'éliminer le parasite. Néanmoins, nous avons pu constater, d'une part, que les traitements antibiotiques favorisaient une HSVC et, d'autre part, que le parasite peut présenter des résistances aux antibiotiques et il s'avère que le ST4 utilisé est notamment résistant au métronidazole.

#### ● Autres sous-types

Notre étude s'est centrée sur le ST4 qui est très répandu en Europe et qui est fortement prévalent chez le rongeur. Néanmoins, le ST3 reste le ST le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme. De ce fait, nous avons évalué l'impact du ST3 sur la perméabilité intestinale et la distension colorectale. Comme décrit pour le ST4, nous avons mis en évidence une HSVC à j30-31 en l'absence d'une augmentation de la perméabilité intestinale à j21 (**Figure 26**). La sensibilité colique des animaux a été également évaluée plus précocement et plus tardivement, à j14 et j42. Dans les deux cas, les animaux infectés présentaient une HSVC. Les deux isolats humains utilisés durant ma thèse ont induit une HSVC chez les animaux infectés, or l'étude d'Hussein *et al*, montre bien que tous les STs n'ont pas la même virulence (Hussein *et al.*, 2008). Afin de faire une analyse comparative entre le ST4 et le ST3, l'inflammation, le comportement ainsi que la dysbiose associée au ST3 doivent être caractérisés.

### ● Co-infection

Une infection multiple ou co-infection par différents parasites est fréquente (Viney et Graham, 2013). Des interactions positives ou négatives peuvent subsister entre les différents parasites lors d'une co-infection. Par ailleurs il n'est pas rare de rencontrer *Blastocystis* en association avec d'autres parasites (Ramírez *et al.*, 2017). De plus, les études montrent un effet synergique entre *Blastocystis* et d'autres protozoaires intestinaux (Arribas *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2012; Young et Yeo, 2014) notamment *Endolimax nana* considéré comme non pathogène (Poulsen et Stensvold, 2016). Nous avons eu l'opportunité d'accéder à des selles de patients présentant *Blastocystis* ST4 et *Entamoeba coli*, une amibe non pathogène fréquente du tube digestif de l'Homme. Nous avons appliqué notre protocole de purification afin d'isoler ces deux parasites et chaque rat a reçu par voie orale  $10^5$  kystes de ST4 avec un nombre indéterminé d'*Entamoeba coli*.

Comme précédemment, la perméabilité intestinale et la sensibilité colique ont été évaluées à j21 et j28 PI, respectivement. De même que pour une infection simple à *Blastocystis*, les animaux co-infectés présentent une HSVC à j28 PI (**Figure 27A**). Le test de distension colorectale a également été réalisé à 8 semaines PI et comme pour la 4<sup>ème</sup> semaine PI, les animaux infectés présentaient une HSVC suggérant que celle-ci perdure dans le temps. De manière intéressante, la perméabilité intestinale est quant à elle augmentée à j21 PI chez les rats infectés, ce qui n'était pas le cas avec une simple infection par *Blastocystis* ST4 (**Figure 27B**) suggérant qu'*Entamoeba coli* pourrait être à l'origine de cet effet. Néanmoins, *Entamoeba coli* est décrite comme non pathogène est donc il est peu probable que cette amibe puisse à elle seule modifier la perméabilité intestinale. On peut alors émettre l'hypothèse qu'*Entamoeba coli* potentialise l'effet de *Blastocystis* sur la perméabilité intestinale. Cependant, il sera nécessaire par la suite d'avoir un groupe de rats infectés seulement par cette souche afin de répondre à ce questionnement.

La composition du microbiote a été analysée par séquençage Illumina à j0 et j28 PI. Comme précédemment une dysbiose intestinale a été caractérisée suite à la co-infection (**Figure 27C**). Cependant, l'analyse taxonomique a révélé des différences entre les deux groupes dès le j0. Afin de s'affranchir de l'effet cage nous avons soustrait les valeurs d'abondance relative du j0 au j28 pour chaque animal. L'abondance relative de six genres bactériens est modifiée significativement : Unclassified *Clostridiaceae*, Unclassified *Clostridiales*, *Lactobacillus*, Unclassified *YS2*, Unclassified *S24-7* et *Prevotella*. On remarque que la dysbiose

associée à cette co-infection diffère de celle associée à *Blastocystis* seul. Cependant, on retrouve dans les deux cas une augmentation significative de l'abondance relative de la famille des *S24-7*. De manière intéressante, on observe une augmentation de l'abondance relative du genre *Prevotella* qui a été décrite récemment comme un facteur de risque dans le développement d'un SII (Su *et al.*, 2018). Parallèlement, on observe une diminution de l'abondance relative des *Lactobacillus* ce qui est largement décrit également chez les patients SII (Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018).

Ces données préliminaires quant à une co-infection parasitaire suggèrent un effet synergique entre *Blastocystis* et *Entamoeba coli*. Une quantification du nombre de kystes d'*Entamoeba coli* ainsi qu'un groupe d'animaux infectés seulement par ce parasite est nécessaire pour déterminer si les effets associés à l'infection par *Blastocystis* sont potentialisés.

---

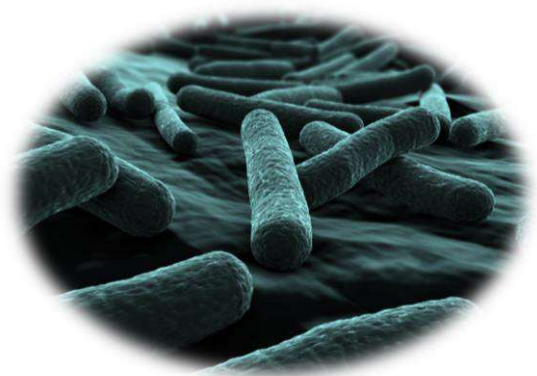
## Conclusion générale

---

Ce travail de thèse a permis dans un premier temps la mise en place d'un nouveau modèle de SII d'origine infectieuse chez le rat mettant en jeu une infection parasitaire par *Blastocystis*. Nous avons ensuite caractérisé les perturbations intestinales mais également centrales associées à cette infection. Dans ce modèle, l'HSVC, couplée à un comportement anxio-dépressif, est associée à une dysbiose intestinale caractérisée par des modifications de la composition du microbiote mais également de son métabolome. Différentes hypothèses ont été apportées quant à l'implication de cette dysbiose dans le développement de l'HSVC. Des travaux préliminaires ont été réalisés au laboratoire afin de répondre à chacune d'elles néanmoins des investigations complémentaires sont nécessaires.

L'ensemble de ces travaux a donc permis d'apporter de nouvelles informations quant aux mécanismes physiopathologiques liés à l'infection par *Blastocystis*. Il faut garder à l'esprit qu'il existe un nombre important de patients asymptomatiques porteurs de *Blastocystis* qui peut s'expliquer par des variations de virulence inter et intra-sous-type mais également par les facteurs propres à l'hôte. Dans cette étude, nous avons été en mesure de montrer que certains isolats humains sont capables d'induire des perturbations intestinales et centrales chez l'animal. Récemment, une étude a remis en cause les recommandations européennes pour la TMF qui place *Blastocystis* dans la liste des pathogènes à rechercher. On ne peut exclure que la variation de virulence d'un ST soit due aux facteurs propres à chaque individu. Il semble nécessaire de rechercher ce parasite chez les patients présentant certains troubles intestinaux. La problématique suivante est de savoir si le traitement antiparasitaire sera bénéfique pour l'hôte. En effet, les traitements actuellement utilisés ne sont pas spécifiques et peuvent altérer le microbiote et favoriser le développement des symptômes. De plus, *Blastocystis* peut présenter de multiples résistances aux antibiotiques. La complexité réside ainsi dans l'absence de diagnostic mais également dans le traitement de l'infection.

## Partie D : Annexe



## Notions d'écologie

### 1. Richesse, abondance, diversité, composition : définitions

La structure d'une communauté microbienne peut être définie selon sa richesse, l'abondance de ses membres, sa diversité et sa composition.

La richesse bactérienne correspond au nombre de taxa présents dans un environnement/échantillon, déterminé à partir des regroupements de séquences en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs). Les OTUs sont des regroupements d'individus de même famille, genre, espèce ou souche bactérien(ne)s si le pourcentage d'identité des séquences est supérieur ou égal à 90%, 95%, 97% et 99%, respectivement

L'abondance correspond au nombre d'individus pour un(e) phylum, classe, ordre, famille, genre, espèce, souche donné(e).

La diversité correspond à l'association entre la richesse et l'abondance des espèces dans un environnement.

La composition correspond à l'identité de chacun des membres de la communauté. Elle est déterminée grâce à l'alignement des séquences obtenues lors du séquençage avec des banques de données qui permettent l'attribution d'une OTU à chaque séquence.

### 2. $\alpha$ -diversité

L' $\alpha$ -diversité est la diversité locale, mesurée au sein d'un échantillon donné, et correspond au nombre d'espèces qui cohabitent dans ce dernier. L' $\alpha$ -diversité peut être décrite grâce à des estimateurs de la richesse (courbes de raréfaction et indice Chao1) et des estimateurs de la diversité (indices de Shannon et Simpson) ou encore par des estimateurs de la richesse phylogénétique.

Les courbes de raréfaction représentent le nombre cumulé d'OTUs pour chaque échantillon en fonction du nombre de séquences étudiées. Cette représentation permet une visualisation rapide du niveau de richesse microbienne entre différents échantillons. L'indice Chao1 correspond quant à lui au nombre d'espèces estimé à partir de celles observées une ou deux fois.

Les indices de Shannon et Simpson sont des indices statistiques prenant en compte la richesse et l'abondance des espèces dans un échantillon. Ils permettent d'étudier l'équitabilité



de la communauté correspondant à l'évaluation du degré de régularité de la répartition du nombre d'individus par espèce. L'indice de Shannon permet de mesurer la répartition des différents individus au sein des différentes populations. Cet indice estime l'incertitude dans la capacité de prédire l'identité du prochain individu sélectionné aléatoirement dans une communauté. L'indice de Simpson estime la probabilité de choisir aléatoirement deux individus d'une communauté comme étant deux espèces différentes. Plus la diversité est grande, plus ces indices sont faibles.

La diversité phylogénétique prend en considération la phylogénie des individus pour estimer la diversité au sein d'un arbre de phylogénie et prend en compte la distance entre les branches

### 3. $\beta$ -diversité

La  $\beta$ -diversité correspond aux variations de composition entre différents échantillons. Cette diversité est étudiée et représentée grâce à des matrices de dissimilarité (Bray et Curtis)/distance UniFrac, des modèles d'ordination et des classifications hiérarchiques.

Les matrices de dissimilarité/distance permettent d'ordonner et de clustériser visuellement la composition des communautés. Ces analyses sont le plus fréquemment effectuées grâce au calcul de l'indice de dissimilarité de Bray et Curtis, un indice qualitatif non-phylogénique et des distances UniFrac. Les distances UniFrac correspondent aux distances entre les communautés microbiennes pour lesquelles les informations phylogénétiques sont disponibles. La distance UniFrac entre une communauté A et une communauté B est définie selon la fraction de branches de l'arbre phylogénétique qui mène aux membres de la communauté A ou de la communauté B mais pas aux deux communautés. Cette mesure correspond à la distance UniFrac non-pondérée (Unweighted UniFrac) et prend donc en considération uniquement la présence ou l'absence des OTUs dans la communauté. L'abondance des OTUs est en revanche prise en compte dans la mesure de la distance UniFrac pondérée (Weighted UniFrac) (Fukuyama *et al.*, 2012).

Ces matrices de distance peuvent ensuite être représentées selon des modèles d'ordination : analyse en coordonnées principales (PCoA) ou cadrage multidimensionnel non-métrique (NMDS) ou selon des classifications hiérarchiques (UGPMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) qui transforment la matrice de distance en arbre enraciné.

## Partie E : Références bibliographiques



- Abbas, Z., Yakoob, J., Jafri, W., Ahmad, Z., Azam, Z., Usman, M.W., Shamim, S., and Islam, M. (2014). Cytokine and clinical response to *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *26*, 630–639.
- 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.H., and Abdel-Raheem, E.M. (2016). Immunopathological assessments of human *Blastocystis* spp. in experimentally infected immunocompetent and immunosuppressed mice. *Parasitol. Res.* *115*, 2061–2071.
- Accarino, A.M., Azpiroz, F., and Malagelada, J.R. (1995). Selective dysfunction of mechanosensitive intestinal afferents in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *108*, 636–643.
- Adeniyi, O.F., Adenike Lesi, O., Olatona, F.A., Esezobor, C.I., and Ikobah, J.M. (2017). Irritable bowel syndrome in adolescents in Lagos. *Pan Afr. Med. J.* *28*, 93.
- Agrawal, A., Houghton, L.A., Morris, J., Reilly, B., Guyonnet, D., Goupil Feuillerat, N., Schlumberger, A., Jakob, S., and Whorwell, P.J. (2009). Clinical trial: the effects of a fermented milk product containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 on abdominal distension and gastrointestinal transit in irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *29*, 104–114.
- Aguilera, M., Cerdà-Cuellar, M., and Martínez, V. (2015). Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes* *6*, 10–23.
- Ahl, A., Mikocka-Walus, A., Gordon, A., and Andrews, J.M. (2013). Are self-administered or minimal therapist contact psychotherapies an effective treatment for irritable bowel syndrome (IBS): A systematic review. *J. Psychosom. Res.* *75*, 113–120.
- Aizawa, E., Sato, Y., Kochiyama, T., Saito, N., Izumiyama, M., Morishita, J., Kanazawa, M., Shima, K., Mushiake, H., Hongo, M., et al. (2012). Altered cognitive function of prefrontal cortex during error feedback in patients with irritable bowel syndrome, based on fMRI and dynamic causal modeling. *Gastroenterology* *143*, 1188–1198.
- Ajjampur, S.S.R., and Tan, K.S.W. (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol. Int.* *65*, 772–779.
- Ajjampur, S.S.R., Png, C.W., Chia, W.N., Zhang, Y., and 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*, e0160458.
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapedra, A., Onuoha, E.S.U., Fagbenro-Beyioku, A.F., and Clark, C.G. (2013). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* *126*, 11–18.
- Andersen, L.O., Bonde, I., Nielsen, H.B., and Stensvold, C.R. (2015). A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* *91*, 1–9.
- Angelakis, E., Merhej, V., and Raoult, D. (2013). Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet. Infect. Dis.* *13*, 889–899.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., and Svärd, S.G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 413–422.
- Annaházi, A., Ferrier, L., Bézirard, V., Lévêque, M., Eutamène, H., Ait-Belgnaoui, A., Coëffier, M., Ducrotté, P., Róka, R., Inczefi, O., et al. (2013). Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 1322–1331.

- Ardelyx. Ardelyx Reports Successful Phase 3 T3MPO-1 Trial Of Tenapanor In Patients With IBS- C. Ardelyx [Http://ir.Ardelyx.Com/News-Releases/News-Release-Details/Ardelyxs-Pivotal-Phase-3-Study-Tenapanor-Ibs-C-Hits-Primary-And](http://ir.Ardelyx.Com/News-Releases/News-Release-Details/Ardelyxs-Pivotal-Phase-3-Study-Tenapanor-Ibs-C-Hits-Primary-And) (2017).
- Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Nakamura, Y., Nakamura, G., Nakamura, F., Yano, T.-A., and Hasegawa, M. (2002). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J. Eukaryot. Microbiol.* *49*, 42–53.
- Arribas, J.M., Fernández, G.H., Escalera, G.I., Pardilla, A.I., Martín, T.A., and González De La Rosa, J.B. (2001). [Acute infectious lymphocytosis associated to *Giardia lamblia* and *Blastocystis hominis* coinfection]. *An. Esp. Pediatr.* *54*, 518–520.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* *473*, 174–180.
- Attali, T.-V., Bouchoucha, M., and Benamouzig, R. (2013). Treatment of refractory irritable bowel syndrome with visceral osteopathy: Short-term and long-term results of a randomized trial. *J. Dig. Dis.* *14*, 654–661.
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., *Blastocystis* Investigation Group, T.B.I., Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., and Chabé, M. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci. Rep.* *6*, 25255.
- Azami, M., Sharifi, M., Hejazi, S.H., and Tazhibi, M. (2010). Intestinal parasitic infections in renal transplant recipients. *Braz. J. Infect. Dis.* *14*, 15–18.
- Babaei, Z., Malihi, N., Zia-Ali, N., Sharifi, I., Mohammadi, M.A., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., Singer, S.M., and Solaymani-Mohammadi, S. (2016). Adaptive immune response in symptomatic and asymptomatic enteric protozoal infection: evidence for a determining role of parasite genetic heterogeneity in host immunity to human giardiasis. *Microbes Infect.* *18*, 687–695.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* (80-. ). *307*, 1915–1920.
- Bálint, A., Dóczy, I., Bereczki, L., Gyulai, R., Szűcs, M., Farkas, K., Urbán, E., Nagy, F., Szepes, Z., Wittmann, T., et al. (2014). Do not forget the stool examination!-cutaneous and gastrointestinal manifestations of *Blastocystis* sp. infection. *Parasitol. Res.* *113*, 1585–1590.
- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., et al. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *126*, 693–702.
- Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., et al. (2007). Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *132*, 26–37.
- Barbara, G., Cremon, C., De Giorgio, R., Dothel, G., Zecchi, L., Bellacosa, L., Carini, G., Stanghellini, V., and Corinaldesi, R. (2011). Mechanisms Underlying Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *13*, 308–315.
- Barbara, G., Feinle-Bisset, C., Ghoshal, U.C., Santos, J., Vanner, S.J., Vergnolle, N., Zoetendal, E.G., and Quigley, E.M. (2016). The Intestinal Microenvironment and Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* *150*, 1305–1318.e8.
- Barish, C.F., Drossman, D., Johanson, J.F., and Ueno, R. (2010). Efficacy and Safety of Lubiprostone in Patients

with Chronic Constipation. *Dig. Dis. Sci.* 55, 1090–1097.

Bashashati, M., Moradi, M., and Sarosiek, I. (2017). Interleukin-6 in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis of IL-6 (-G174C) and circulating IL-6 levels. *Cytokine* 99, 132–138.

Bashashati, M., Moossavi, S., Cremon, C., Barbaro, M.R., Moraveji, S., Talmon, G., Rezaei, N., Hughes, P.A., Bian, Z.X., Choi, C.H., et al. (2018). Colonic immune cells in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol. Motil.* 30, e13192.

Baştürk, A., Artan, R., and Yılmaz, A. (2016). Efficacy of synbiotic, probiotic, and prebiotic treatments for irritable bowel syndrome in children: A randomized controlled trial. *Turk. J. Gastroenterol.* 27, 439–443.

Belmonte, L., Beutheu Youmba, S., Bertiaux-Vandaële, N., Antonietti, M., Lecleire, S., Zalar, A., Gourcerol, G., Leroi, A.-M., Déchelotte, P., Coëffier, M., et al. (2012). Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS One* 7, e42777.

Bengtson, M.-B., Ronning, T., Vatn, M.H., and Harris, J.R. (2006). Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut* 55, 1754–1759.

Bengtson, M.-B., Aamodt, G., Vatn, M.H., and Harris, J.R. (2015). Co-occurrence of IBS and symptoms of anxiety or depression, among Norwegian twins, is influenced by both heredity and intrauterine growth. *BMC Gastroenterol.* 15, 9.

Bercík, P., Wang, L., Verdú, E.F., Mao, Y.K., Blennerhassett, P., Khan, W.I., Kean, I., Tougas, G., and Collins, S.M. (2004). Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 127, 179–187.

Berman, S.M., Chang, L., Suyenobu, B., Derbyshire, S.W., Stains, J., Fitzgerald, L., Mandelkern, M., Hamm, L., Vogt, B., Naliboff, B.D., et al. (2002). Condition-specific deactivation of brain regions by 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist Alosetron. *Gastroenterology* 123, 969–977.

Bertiaux-Vandaële, N., Youmba, S.B., Belmonte, L., Lecleire, S., Antonietti, M., Gourcerol, G., Leroi, A.-M., Déchelotte, P., Ménard, J.-F., Ducrotté, P., et al. (2011). The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 2165–2173.

Beyder, A., Mazzone, A., Strege, P.R., Tester, D.J., Saito, Y.A., Bernard, C.E., Enders, F.T., Ek, W.E., Schmidt, P.T., Dlugosz, A., et al. (2014). Loss-of-Function of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 (Channelopathies) in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 146, 1659–1668.

Biesiekierski, J.R., Newnham, E.D., Irving, P.M., Barrett, J.S., Haines, M., Doecke, J.D., Shepherd, S.J., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2011). Gluten Causes Gastrointestinal Symptoms in Subjects Without Celiac Disease: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 508–514.

Biesiekierski, J.R., Peters, S.L., Newnham, E.D., Rosella, O., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2013). No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology* 145, 320-8.e1-3.

Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., and Wells, J.M. (2014). Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 14, 189.

Boeckstaens, G., Camilleri, M., Sifrim, D., Houghton, L.A., Elsenbruch, S., Lindberg, G., Azpiroz, F., and Parkman, H.P. (2016). Fundamentals of Neurogastroenterology: Physiology/Motility – Sensation. *Gastroenterology* 150,

1292–1304.e2.

Bogovič Matijašić, B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Sernel, T., Locatelli, I., Kos, M., Šmid, A., and Rogelj, I. (2016). Effects of synbiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 on the fecal microbiota of adults with irritable bowel syndrome: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J. Dairy Sci.* *99*, 5008–5021.

Böhmelt, A.H., Nater, U.M., Franke, S., Hellhammer, D.H., and Ehlert, U. (2005). Basal and Stimulated Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity in Patients With Functional Gastrointestinal Disorders and Healthy Controls. *Psychosom. Med.* *67*, 288–294.

Böhn, L., Störsrud, S., Törnblom, H., Bengtsson, U., and Simrén, M. (2013). Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 634–641.

Boreham, P.F., and Stenzel, D.J. (1993). *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.* *32*, 1–70.

Botschuijver, S., Roeselers, G., Levin, E., Jonkers, D.M., Welting, O., Heinsbroek, S.E.M., de Weerd, H.H., Boekhout, T., Fornai, M., Masclee, A.A., et al. (2017). Intestinal Fungal Dysbiosis Is Associated With Visceral Hypersensitivity in Patients With Irritable Bowel Syndrome and Rats. *Gastroenterology* *153*, 1026–1039.

Bradford, K., Shih, W., Vidlock, E.J., Presson, A.P., Naliboff, B.D., Mayer, E.A., and Chang, L. (2012). Association Between Early Adverse Life Events and Irritable Bowel Syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 385–390.e3.

Brint, E.K., MacSharry, J., Fanning, A., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2011). Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 329–336.

Brown, P.M., Drossman, D.A., Wood, A.J.J., Cline, G.A., Frazier, K.S., Jackson, J.I., Bronner, J., Freiman, J., Zambrowicz, B., Sands, A., et al. (2011). The Tryptophan Hydroxylase Inhibitor LX1031 Shows Clinical Benefit in Patients With Nonconstipating Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *141*, 507–516.

Buhner, S., Li, Q., Vignali, S., Barbara, G., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Cremon, C., Zeller, F., Langer, R., Daniel, H., et al. (2009). Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *137*, 1425–1434.

Camilleri, M., Busciglio, I., Carlson, P., McKinzie, S., Burton, D., Baxter, K., Ryks, M., and Zinsmeister, A.R. (2008). Candidate genes and sensory functions in health and irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *295*, G219–G225.

Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Van Meerveld, B.G., Verne, G.N., and Verne, G.N. (2012a). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 503–512.

Camilleri, M., Lasch, K., and Zhou, W. (2012b). Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *303*, G775-85.

Camilleri, M., Kolar, G.J., Vazquez-Roque, M.I., Carlson, P., Burton, D.D., and Zinsmeister, A.R. (2013). Cannabinoid receptor 1 gene and irritable bowel syndrome: phenotype and quantitative traits. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *304*, G553-60.

Cammarota, G., Ianaro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., et al. (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* *66*, 569–580.

- Casero, R.D., Mongi, F., Sánchez, A., and Ramírez, J.D. (2015). *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Trop.* *148*, 156–161.
- Cash, B.D., Epstein, M.S., and Shah, S.M. (2016). A Novel Delivery System of Peppermint Oil Is an Effective Therapy for Irritable Bowel Syndrome Symptoms. *Dig. Dis. Sci.* *61*, 560–571.
- Cassidy, M.F., Stenzel, D.J., and Boreham, P.F. (1994). Electron microscopy of surface structures of *Blastocystis* sp. from different hosts. *Parasitol. Res.* *80*, 505–511.
- Castro, J., Harrington, A.M., Hughes, P.A., Martin, C.M., Ge, P., Shea, C.M., Jin, H., Jacobson, S., Hannig, G., Mann, E., et al. (2013). Linaclotide inhibits colonic nociceptors and relieves abdominal pain via guanylate cyclase-C and extracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Gastroenterology* *145*, 1334-46.e1-11.
- Cenac, N., Andrews, C.N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N.W., et al. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* *117*, 636–647.
- Chadwick, V.S., Chen, W., Shu, D., Paulus, B., Bethwaite, P., Tie, A., and Wilson, I. (2002). Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *122*, 1778–1783.
- Chan, K.H., Chandramathi, S., Suresh, K., Chua, K.H., and Kuppusamy, U.R. (2012). Effects of symptomatic and asymptomatic isolates of *Blastocystis hominis* on colorectal cancer cell line, HCT116. *Parasitol. Res.* *110*, 2475–2480.
- Chandramathi, S., Suresh, K., and Kuppusamy, U.R. (2010a). Solubilized antigen of *Blastocystis hominis* facilitates the growth of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol. Res.* *106*, 941–945.
- Chandramathi, S., Suresh, K.G., Mahmood, A.A., and Kuppusamy, U.R. (2010b). Urinary hyaluronidase activity in rats infected with *Blastocystis hominis*-evidence for invasion? *Parasitol. Res.* *106*, 1459–1463.
- Chandramathi, S., Suresh, K., Anita, Z.B., and Kuppusamy, U.R. (2012). Infections of *Blastocystis hominis* and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *106*, 267–269.
- Chandramathi, S., Suresh, K., Sivanandam, S., and Kuppusamy, U.R. (2014). Stress exacerbates infectivity and pathogenicity of *Blastocystis hominis*: *in vitro* and *in vivo* evidences. *PLoS One* *9*, e94567.
- Chandramathi, S., Suresh, K., Shuba, S., Mahmood, A., And Kuppusamy, U.R. (2010). High levels of oxidative stress in rats infected with *Blastocystis hominis*. *Parasitology* *137*, 605.
- Chang, I., sundaresh, s., elliot, j., anton, p. a., baldi, p., licudine, a., mayer, m., vuong, t., hirano, m., naliboff, b. d., et al. (2009). Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* *21*, 149–159.
- Chang, L., Chey, W.D., Harris, L., Olden, K., Surawicz, C., and Schoenfeld, P. (2006). Incidence of ischemic colitis and serious complications of constipation among patients using alosetron: systematic review of clinical trials and post-marketing surveillance data. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 1069–1079.
- Chao, G.-Q., and Zhang, S. (2014). Effectiveness of acupuncture to treat irritable bowel syndrome: A meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* *20*, 1871.
- Charbonneau, D., Gibb, R.D., and Quigley, E.M.M. (2013). Fecal excretion of *Bifidobacterium infantis* 35624 and changes in fecal microbiota after eight weeks of oral supplementation with encapsulated probiotic. *Gut Microbes* *4*, 201–211.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015). Dietary

- emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* *519*, 92–96.
- Chehoud, C., Albenberg, L.G., Judge, C., Hoffmann, C., Grunberg, S., Bittinger, K., Baldassano, R.N., Lewis, J.D., Bushman, F.D., and Wu, G.D. (2015). Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 1948–1956.
- Chen, X.Q., Singh, M., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Moe, K.T., and Yap, E.H. (1997). Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitol. Res.* *83*, 313–318.
- Chen, X.Q., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., and Yap, E.H. (1999). *In vitro* encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology* *118* ( Pt 2), 151–160.
- Chey, W.D., Lembo, A.J., Lavins, B.J., Shiff, S.J., Kurtz, C.B., Currie, M.G., MacDougall, J.E., Jia, X.D., Shao, J.Z., Fitch, D.A., et al. (2012). Linaclotide for irritable bowel syndrome with constipation: a 26-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate efficacy and safety. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 1702–1712.
- Chey, W.D., Lembo, A.J., and Rosenbaum, D.P. (2017). Tenapanor Treatment of Patients With Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome: A Phase 2, Randomized, Placebo-Controlled Efficacy and Safety Trial. *Am. J. Gastroenterol.* *112*, 763–774.
- Cho, H., Jang, Y., Lee, B., Chun, H., Jung, J., Kim, S.M., Hwang, S.W., and Oh, U. (2013). Voluntary movements as a possible non-reflexive pain assay. *Mol. Pain* *9*, 25.
- Choi, C.H., Jo, S.Y., Park, H.J., Chang, S.K., Byeon, J.-S., and Myung, S.-J. (2011). A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of *saccharomyces boulardii* in irritable bowel syndrome: effect on quality of life. *J. Clin. Gastroenterol.* *45*, 679–683.
- Choi, Y.J., Hwang, S.W., Kim, N., Park, J.H., Oh, J.C., and Lee, D.H. (2014). Association Between SLC6A4 Serotonin Transporter Gene Lanked Polymorphic Region and ADRA2A –1291C>G and Irritable Bowel Syndrome in Korea. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *20*, 388–399.
- Chumpitazi, B.P., Weidler, E.M., Czyzewski, D.I., Self, M.M., Heitkemper, M., and Shulman, R.J. (2017). Childhood Irritable Bowel Syndrome Characteristics Are Related to Both Sex and Pubertal Development. *J. Pediatr.* *180*, 141–147.e1.
- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L.-L., Monchy, S., et al. (2017). Molecular Epidemiology of *Blastocystis* sp. in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. *PLoS One* *12*, e0169659.
- Cifre, S., Gozalbo, M., Ortiz, V., Soriano, J.M., Merino, J.F., and Trelis, M. (2018). *Blastocystis* subtypes and their association with Irritable Bowel Syndrome. *Med. Hypotheses* *116*, 4–9.
- Clark, C.G., and Diamond, L.S. (2002). Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.* *15*, 329–341.
- Clavé, P. (2011). Treatment of IBS-D with 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists vs spasmolytic agents: similar therapeutical effects from heterogeneous pharmacological targets. *Neurogastroenterol. Motil.* *23*, 1051–1055.
- Clavé, P., and Tack, J. (2017). Efficacy of otilonium bromide in irritable bowel syndrome: a pooled analysis. *Therap. Adv. Gastroenterol.* *10*, 311–322.
- Coëffier, M., Gloro, R., Boukhattala, N., Aziz, M., Leclaire, S., Vandaele, N., Antonietti, M., Savoye, G., Bôle-Feysot, C., Déchelotte, P., et al. (2010). Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *105*, 1181–1188.



- Collinet-Adler, S., and Ward, H.D. (2010). Cryptosporidiosis: environmental, therapeutic, and preventive challenges. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 927–935.
- Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E.F., Huizinga, J.D., and Ratcliffe, E.M. (2014). Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 98–107.
- Contreras, V.T., De Lima, A.R., and Zorrilla, G. Trypanosoma cruzi: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, 753–760.
- Corsetti, M., Akyuz, F., and Tack, J. (2015). Targeting tachykinin receptors for the treatment of functional gastrointestinal disorders with a focus on irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 1354–1370.
- Coyle, C.M., Varughese, J., Weiss, L.M., and Tanowitz, H.B. (2012). *Blastocystis*: to treat or not to treat... *Clin. Infect. Dis.* 54, 105–110.
- Cremon, C., Gargano, L., Morselli-Labate, A.M., Santini, D., Cogliandro, R.F., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., and Barbara, G. (2009). Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 392–400.
- Cremon, C., Carini, G., Wang, B., Vasina, V., Cogliandro, R.F., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Grundy, D., Tonini, M., De Ponti, F., et al. (2011). Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 1290–1298.
- Cremon, C., Stanghellini, V., Pallotti, F., Fogacci, E., Bellacosa, L., Morselli-Labate, A.M., Paccapelo, A., Di Nardo, G., Cogliandro, R.F., De Giorgio, R., et al. (2014). Salmonella gastroenteritis during childhood is a risk factor for irritable bowel syndrome in adulthood. *Gastroenterology* 147, 69–77.
- Crouzet, L., Gaultier, E., Del'Homme, C., Cartier, C., Delmas, E., Dapoigny, M., Fioramonti, J., and Bernalier-Donadille, A. (2013). The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, e272-82.
- Crumevolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., Naudon, L., and Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 42, 207–217.
- Cummings, J.H., and Macfarlane, G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* 21, 357–365.
- Czogalla, B., Schmitteckert, S., Houghton, L.A., Sayuk, G.S., Camilleri, M., Olivo-Diaz, A., Spiller, R., Wouters, M.M., Boeckxstaens, G., Bermejo, J.L., et al. (2015). A meta-analysis of immunogenetic Case-Control Association Studies in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 717–727.
- D'Anchino, M., Orlando, D., and De Feudis, L. (2002). Giardia lamblia infections become clinically evident by eliciting symptoms of irritable bowel syndrome. *J. Infect.* 45, 169–172.
- Dagci, H., Kurt, Ö., Demirel, M., Mandiracioglu, A., Aydemir, S., Saz, U., Bart, A., and VAN Gool, T. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iran. J. Parasitol.* 9, 519–529.
- Dapoigny, M., Piche, T., Ducrotte, P., Lunaud, B., Cardot, J.-M., and Bernalier-Donadille, A. (2012). Efficacy and safety profile of LCR35 complete freeze-dried culture in irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind study. *World J. Gastroenterol.* 18, 2067–2075.
- Defrees, D.N., and Bailey, J. (2017). Irritable Bowel Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and

Treatment. *Prim. Care* 44, 655–671.

Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., et al. (2011). Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 12, R29.

Dickhaus, B., Mayer, E.A., Firooz, N., Stains, J., Conde, F., Olivas, T.I., Fass, R., Chang, L., Mayer, M., and Naliboff, B.D. (2003). Irritable bowel syndrome patients show enhanced modulation of visceral perception by auditory stress. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 135–143.

Dickson, I. (2018). IBS: High FODMAP diet induces LPS-derived intestinal inflammation and visceral hypersensitivity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 68.

Dinan, T.G., Quigley, E.M.M., Ahmed, S.M.M., Scully, P., O'Brien, S., O'Mahony, L., O'Mahony, S., Shanahan, F., and Keeling, P.W.N. (2006). Hypothalamic-Pituitary-Gut Axis Dysregulation in Irritable Bowel Syndrome: Plasma Cytokines as a Potential Biomarker? *Gastroenterology* 130, 304–311.

Distrutti, E., Monaldi, L., Ricci, P., and Fiorucci, S. (2016). Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies. *World J. Gastroenterol.* 22, 2219–2241.

Dlugosz, A., Nowak, P., D'Amato, M., Mohammadian Kermani, G., Nyström, J., Abdurahman, S., and Lindberg, G. (2015). Increased serum levels of lipopolysaccharide and anti-flagellin antibodies in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 1747–1754.

Dogruman-AI, F., Turk, S., Adiyaman-Korkmaz, G., Hananel, A., Levi, L., Kopelowitz, J., Babai, O., Gross, S., Greenberg, Z., Herschkovitz, Y., et al. (2015). A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. *Parasitol. Res.* 114, 495–500.

Domínguez-Márquez, M.V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M.T., and Borrás, R. (2009). High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol. Res.* 105, 949–955.

Dong, L., Dingguo, L., Xiaoxing, X., and Hanming, L. (2005). An Epidemiologic Study of Irritable Bowel Syndrome in Adolescents and Children in China: A School-Based Study. *Pediatrics* 116, e393–e396.

Dormond, M., Gutierrez, R.L., and Porter, C.K. (2016). *Giardia lamblia* infection increases risk of chronic gastrointestinal disorders. *Trop. Dis. Travel Med. Vaccines* 2, 17.

Downs, I.A., Aroniadis, O.C., Kelly, L., and Brandt, L.J. (2017). Postinfection Irritable Bowel Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 51, 869–877.

Dreesen, L., De Bosscher, K., Grit, G., Staels, B., Lubberts, E., Bauge, E., and Geldhof, P. (2014). *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective interleukin 17A response and induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Infect. Immun.* 82, 3333–3340.

Drossman, D.A. (2006). The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III Process. *Gastroenterology* 130, 1377–1390.

Drossman, D.A. (2011). Abuse, trauma, and GI illness: is there a link? *Am. J. Gastroenterol.* 106, 14–25.

Drossman, D.A. (2016). Functional gastrointestinal disorders: what's new for Rome IV? *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 1, 6–8.

Drossman, D.A., Patrick, D.L., Whitehead, W.E., Toner, B.B., Diamant, N.E., Hu, Y., Jia, H., and Bangdiwala, S.I. (2000). Further validation of the IBS-QOL: a disease-specific quality-of-life questionnaire. *Am. J. Gastroenterol.* 95,

999–1007.

Drossman, D.A., Chey, W.D., Johanson, J.F., Fass, R., Scott, C., Panas, R., and Ueno, R. (2009). Clinical trial: lubiprostone in patients with constipation-associated irritable bowel syndrome—results of two randomized, placebo-controlled studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *29*, 329–341.

Duboc, H., Rainteau, D., Rajca, S., Humbert, L., Farabos, D., Maubert, M., Grondin, V., Jouet, P., Bouhassira, D., Seksik, P., et al. (2012). Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 513–e247.

Ducrotté, P., Sawant, P., and Jayanthi, V. (2012). Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* *18*, 4012–4018.

Dunlop, S.P., Hebden, J., Campbell, E., Naesdal, J., Olbe, L., Perkins, A.C., and Spiller, R.C. (2006). Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 1288–1294.

Dunn, L.A., Boreham, P.F., and Stenzel, D.J. (1989). Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *Int. J. Parasitol.* *19*, 43–56.

Dusko Ehrlich, S., and MetaHIT consortium (2010). Metagenomics of the intestinal microbiota: potential applications. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *34*, S23–S28.

Efskind, P.S., Bernklev, T., and Vatn, M.H. (1996). A Double-Blind Placebo-Controlled Trial with Loperamide in Irritable Bowel Syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* *31*, 463–468.

Ehlert, U., Nater, U.M., and Böhmelt, A. (2005). High and low unstimulated salivary cortisol levels correspond to different symptoms of functional gastrointestinal disorders. *J. Psychosom. Res.* *59*, 7–10.

El-Salhy, M., Ostgaard, H., Gundersen, D., Hatlebakk, J.G., and Hausken, T. (2012). The role of diet in the pathogenesis and management of irritable bowel syndrome (Review). *Int. J. Mol. Med.* *29*, 723–731.

Elsenbruch, S., and Orr, W.C. (2001). Diarrhea- and constipation-predominant IBS patients differ in postprandial autonomic and cortisol responses. *Am. J. Gastroenterol.* *96*, 460–466.

Elsenbruch, S., Holtmann, G., Oezcan, D., Lysson, A., Janssen, O., Goebel, M.U., and Schedlowski, M. (2004). Are There Alterations of Neuroendocrine and Cellular Immune Responses to Nutrients in Women with Irritable Bowel Syndrome? *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 703–710.

Elsenbruch, S., Rosenberger, C., Bingel, U., Forsting, M., Schedlowski, M., and Gizewski, E.R. (2010). Patients with irritable bowel syndrome have altered emotional modulation of neural responses to visceral stimuli. *Gastroenterology* *139*, 1310–1319.

Elwakil, H.S., and Hewedi, I.H. (2010). Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitol. Res.* *107*, 685–689.

Eme, L., Gentekaki, E., Curtis, B., Archibald, J.M., and Roger, A.J. (2017). Lateral Gene Transfer in the Adaptation of the Anaerobic Parasite *Blastocystis* to the Gut. *Curr. Biol.* *27*, 807–820.

Enck, P., and Mazurak, N. (2018). Dysbiosis in Functional Bowel Disorders. *Ann. Nutr. Metab.* *72*, 296–306.

Enck, P., Aziz, Q., Barbara, G., Farmer, A.D., Fukudo, S., Mayer, E.A., Niesler, B., Quigley, E.M.M., Rajilić-Stojanović, M., Schemann, M., et al. (2016). Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* *2*, 16014.

Endo, Y., Shoji, T., Fukudo, S., Machida, T., Machida, T., Noda, S., and Hongo, M. (2011). The features of

- adolescent irritable bowel syndrome in Japan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *26*, 106–109.
- Engsbro, A.L., Simrén, M., and Bytzer, P. (2012a). The Rome II and Rome III criteria identify the same subtype-populations in irritable bowel syndrome: agreement depends on the method used for symptom report. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 604-e266.
- Engsbro, A.L., Stensvold, C.R., Nielsen, H. V., and Bytzer, P. (2012b). Treatment of *Dientamoeba fragilis* in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *87*, 1046–1052.
- Eroglu, F., Genc, A., Elgun, G., and Koltas, I.S. (2009). Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol. Res.* *105*, 1589–1592.
- Eswaran, S., Tack, J., and Chey, W.D. (2011). Food: the forgotten factor in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterol. Clin. North Am.* *40*, 141–162.
- Eutamène, H., Garcia-Rodenas, C.L., Yvon, S., d'Aldebert, E., Foata, F., Berger, B., Sauser, J., Theodorou, V., Bergonzelli, G., and Mas, E. (2017). Luminal contents from the gut of colicky infants induce visceral hypersensitivity in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* *29*, e12994.
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., et al. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (80-. )*. *352*, 560–564.
- Farup, P.G., Rudi, K., and Hestad, K. (2016). Faecal short-chain fatty acids - a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome? *BMC Gastroenterol.* *16*, 51.
- Fayer, R., Elsasser, T., Gould, R., Solano, G., Urban, J., and Santin, M. (2014). *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitol. Res.* *113*, 1465–1472.
- FitzGerald, L.Z., Kehoe, P., and Sinha, K. (2009). Hypothalamic--pituitary-- adrenal axis dysregulation in women with irritable bowel syndrome in response to acute physical stress. *West. J. Nurs. Res.* *31*, 818–836.
- Florance, B.-M., Frin, G., Dainese, R., Nébot-Vivinus, M.-H., Marine Barjoan, E., Marjoux, S., Laurens, J.-P., Payrouse, J.-L., Hébuterne, X., and Piche, T. (2012). Osteopathy improves the severity of irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *24*, 944–949.
- Fond, G., Loundou, A., Hamdani, N., Boukouaci, W., Dargel, A., Oliveira, J., Roger, M., Tamouza, R., Leboyer, M., and Boyer, L. (2014). Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* *264*, 651–660.
- Ford, A.C., Talley, N.J., Spiegel, B.M.R., Foxx-Orenstein, A.E., Schiller, L., Quigley, E.M.M., and Moayyedi, P. (2008). Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* *337*, a2313.
- Ford, A.C., Brandt, L.J., Young, C., Chey, W.D., Foxx-Orenstein, A.E., and Moayyedi, P. (2009). Efficacy of 5-HT<sub>3</sub> antagonists and 5-HT<sub>4</sub> agonists in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *104*, 1831–43; quiz 1844.
- Ford, A.C., Moayyedi, P., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., Quigley, E.M.M., and Task Force on the Management of Functional Bowel Disorders (2014b). American College of Gastroenterology monograph on the management of irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation. *Am. J. Gastroenterol.* *109 Suppl 1*, S2–26; quiz S27.
- Ford, A.C., Quigley, E.M.M., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., and

- Moayyedi, P. (2014a). Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *109*, 1547-61; quiz 1546, 1562.
- Fourie, N.H., Peace, R.M., Abey, S.K., Sherwin, L.B., Rahim-Williams, B., Smyser, P.A., Wiley, J.W., and Henderson, W.A. (2014). Elevated circulating miR-150 and miR-342-3p in patients with irritable bowel syndrome. *Exp. Mol. Pathol.* *96*, 422–425.
- Fukami, K., Fukami, K., Sekiguchi, F., Sekiguchi, F., Kawabata, A., and Kawabata, A. (2017). Hydrogen Sulfide and T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion. *Pharmacology* *99*, 196–203.
- Fukudo, S., Nomura, T., and Hongo, M. (1998). Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *Gut* *42*, 845–849.
- Fukudo, S., Ida, M., Akiho, H., Nakashima, Y., and Matsueda, K. (2014). Effect of ramosetron on stool consistency in male patients with irritable bowel syndrome with diarrhea. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *12*, 953–9.e4.
- Fukudo, S., Kinoshita, Y., Okumura, T., Ida, M., Akiho, H., Nakashima, Y., Nishida, A., and Haruma, K. (2016). Ramosetron Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome With Diarrhea and Improves Quality of Life in Women. *Gastroenterology* *150*, 358–66.e8.
- Gade, J., and Thorn, P. (1989). Paragurt for patients with irritable bowel syndrome. A controlled clinical investigation from general practice. *Scand. J. Prim. Health Care* *7*, 23–26.
- Garabadu, D., and Krishnamurthy, S. (2014). Asparagus racemosus Attenuates Anxiety-Like Behavior in Experimental Animal Models. *Cell. Mol. Neurobiol.* *34*, 511–521.
- Garavelli, P.L., Zierdt, C.H., Fleisher, T.A., Liss, H., and Nagy, B. (1995). Serum antibody detected by fluorescent antibody test in patients with symptomatic *Blastocystis hominis* infection. *Recenti Prog. Med.* *86*, 398–400.
- Gargari, G., Taverniti, V., Gardana, C., Cremon, C., Canducci, F., Pagano, I., Barbaro, M.R., Bellacosa, L., Castellazzi, A.M., Valsecchi, C., et al. (2018). Fecal Clostridiales distribution and short-chain fatty acids reflect bowel habits in irritable bowel syndrome. *Environ. Microbiol.*
- Garsed, K., Chernova, J., Hastings, M., Lam, C., Marciani, L., Singh, G., Henry, A., Hall, I., Whorwell, P., and Spiller, R. (2014). A randomised trial of ondansetron for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhoea. *Gut* *63*, 1617–1625.
- Gentekaki, E., Curtis, B.A., Stairs, C.W., Klimeš, V., Eliáš, M., Salas-Leiva, D.E., Herman, E.K., Eme, L., Arias, M.C., Henrissat, B., et al. (2017). Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLOS Biol.* *15*, e2003769.
- Gershon, M.D., and Tack, J. (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* *132*, 397–414.
- Gheinani, A.H., Burkhard, F.C., and Monastyrskaya, K. (2013). Deciphering microRNA code in pain and inflammation: lessons from bladder pain syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 3773–3789.
- Ghosh, K., Ayyaril, M., and Nirmala, V. (1998). Acute GVHD involving the gastrointestinal tract and infestation with *Blastocystis hominis* in a patient with chronic myeloid leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *22*, 1115–1117.
- Giannetti, E., Maglione, M., Sciorio, E., Coppola, V., Miele, E., and Staiano, A. (2017). Do Children Just Grow Out

- of Irritable Bowel Syndrome? *J. Pediatr.* *183*, 122–126.e1.
- Gibson, P.R. (2011). Food intolerance in functional bowel disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *26*, 128–131.
- Gibson, G.R., and Wang, X. (1994b). Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol.* *11*, 491–498.
- Gibson, G.R., and Wang, X. (1994a). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* *77*, 412–420.
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science (80- )*. *312*, 1355–1359.
- Goodwin, L., White, P.D., Hotopf, M., Stansfeld, S.A., and Clark, C. (2013). Life course study of the etiology of self-reported irritable bowel syndrome in the 1958 British birth cohort. *Psychosom. Med.* *75*, 202–210.
- Greenwood-van Meerveld, B. (2007). Importance of 5-hydroxytryptamine receptors on intestinal afferents in the regulation of visceral sensitivity. *Neurogastroenterol. Motil.* *19 Suppl 2*, 13–18.
- Guglielmetti, S., Mora, D., Gschwender, M., and Popp, K. (2011). Randomised clinical trial: Bifidobacterium bifidum MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life--a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *33*, 1123–1132.
- Gupta, R., and Parsi, K. (2006). Chronic urticaria due to *Blastocystis hominis*. *Australas. J. Dermatol.* *47*, 117–119.
- Guyonnet, D., Chassany, O., Ducrotte, P., Picard, C., Mouret, M., Mercier, C.-H., and Matuchansky, C. (2007). Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium animalis DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *26*, 475–486.
- Gwee, K. -A. (2005). Irritable bowel syndrome in developing countries - a disorder of civilization or colonization?. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 317–324.
- Gwee, K.-A., Lu, C.-L., and Ghoshal, U.C. (2009). Epidemiology of irritable bowel syndrome in Asia: something old, something new, something borrowed. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *24*, 1601–1607.
- Halkjær, S.I., Boolsen, A.W., Günther, S., Christensen, A.H., and Petersen, A.M. (2017). Can fecal microbiota transplantation cure irritable bowel syndrome? *World J. Gastroenterol.* *23*, 4112.
- Halkjær, S.I., Christensen, A.H., Lo, B.Z.S., Browne, P.D., Günther, S., Hansen, L.H., and Petersen, A.M. (2018). Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: results from a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Gut* *gutjnl-2018-316434*.
- Halmos, E.P., Power, V.A., Shepherd, S.J., Gibson, P.R., and Muir, J.G. (2014). A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *146*, 67–75.e5.
- Halpern, G.M., Prindiville, T., Blankenburg, M., Hsia, T., and Gershwin, M.E. (1996). Treatment of irritable bowel syndrome with Lacteol Fort: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Am. J. Gastroenterol.* *91*, 1579–1585.
- Halpert, A. (2018). Irritable Bowel Syndrome: Patient-Provider Interaction and Patient Education. *J. Clin. Med.* *7*, 3.
- Hamad, I., Abou Abdallah, R., Ravoux, I., Mokhtari, S., Tissot-Dupont, H., Michelle, C., Stein, A., Lagier, J.-C., Raoult, D., and Bittar, F. (2018). Metabarcoding analysis of eukaryotic microbiota in the gut of HIV-infected patients. *PLoS One* *13*, e0191913.

- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., And Brummer, R.-J. (2007). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27, 104–119.
- Hanevik, K., Wensaas, K.-A., Rortveit, G., Eide, G.E., Mørch, K., and Langeland, N. (2014). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 6 years after giardia infection: a controlled prospective cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 59, 1394–1400.
- Haresh, K., Suresh, K., Khairul Anus, A., and Saminathan, S. (1999). Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Trop. Med. Int. Health* 4, 274–277.
- Hauser, G., Pletikotic, S., and Tkalcic, M. (2014). Cognitive behavioral approach to understanding irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 20, 6744.
- Hayes, P.A., Fraher, M.H., and Quigley, E.M.M. (2014). Irritable bowel syndrome: the role of food in pathogenesis and management. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* 10, 164–174.
- Heitkemper, M., Jarrett, M., Cain, K., Shaver, J., Bond, E., Woods, N.F., and Walker, E. (1996). Increased urine catecholamines and cortisol in women with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 91, 906–913.
- Heitkemper, M., Jarrett, M., Cain, K.C., Burr, R., Levy, R.L., Feld, A., and Hertig, V. (2001). Autonomic nervous system function in women with irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 46, 1276–1284.
- Heitkemper, M., Jarrett, M., Bond, E.F., and Chang, L. (2003). Impact of Sex and Gender on Irritable Bowel Syndrome. *Biol. Res. Nurs.* 5, 56–65.
- Heizer, W.D., Southern, S., and McGovern, S. (2009). The role of diet in symptoms of irritable bowel syndrome in adults: a narrative review. *J. Am. Diet. Assoc.* 109, 1204–1214.
- Hershfield, N.B. (2005). Nongastrointestinal symptoms of irritable bowel syndrome: an office-based clinical survey. *Can. J. Gastroenterol.* 19, 231–234.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514.
- Holzer, P., and Holzer-Petsche, U. (1997). Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol. Ther.* 73, 173–217.
- Hooper, L. V, Littman, D.R., and Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268–1273.
- Hughes, P.A., Zola, H., Penttila, I.A., Blackshaw, L.A., Andrews, J.M., and Krumbiegel, D. (2013). Immune activation in irritable bowel syndrome: can neuroimmune interactions explain symptoms? *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1066–1074.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214.
- Hussain, R., Jaferi, W., Zuberi, S., Baqai, R., Abrar, N., Ahmed, A., and Zaman, V. (1997). Significantly increased IgG2 subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 301–306.
- Hussein, E.M., Hussein, A.M., Eida, M.M., and Atwa, M.M. (2008). Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol. Res.* 102, 853–860.

- Ibrahim, A.N., Al-Ashkar, A.M., and Nazeer, J.T. (2018). Additional Glance on the Role of *Dientamoeba fragilis* & *Blastocystis hominis* in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Iran. J. Parasitol.* *13*, 100–107.
- Icaza-Chávez, M.E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev. Gastroenterol. México* *78*, 240–248.
- Iguchi, A., Ebisu, A., Nagata, S., Saitou, Y., Yoshikawa, H., Iwatani, S., and Kimata, I. (2007). Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. *Parasitol. Int.* *56*, 107–112.
- Iguchi, A., Yoshikawa, H., Yamada, M., Kimata, I., and 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*, 135–140.
- Iliev, I.D., Funari, V.A., Taylor, K.D., Nguyen, Q., Reyes, C.N., Strom, S.P., Brown, J., Becker, C.A., Fleshner, P.R., Dubinsky, M., et al. (2012). Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* *336*, 1314–1317.
- Isshiki, S., Togayachi, A., Kudo, T., Nishihara, S., Watanabe, M., Kubota, T., Kitajima, M., Shiraishi, N., Sasaki, K., Andoh, T., et al. (1999). Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine beta1,3-galactosyltransferase (beta3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom. *J. Biol. Chem.* *274*, 12499–12507.
- Ivory, C., Kammanadiminti, S., and Chadee, K. (2007). Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. *Trends Parasitol.* *23*, 46–48.
- Jadallah, K.A., Nimri, L.F., and Ghanem, R.A. (2017). Protozoan parasites in irritable bowel syndrome: A case-control study. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* *8*, 201–207.
- Jahng, J., Jung, I.S., Choi, E.J., Conklin, J.L., and Park, H. (2012). The effects of methane and hydrogen gases produced by enteric bacteria on ileal motility and colonic transit time. *Neurogastroenterol. Motil.* *24*, 185–190, e92.
- Jalanka-Tuovinen, J., Salojärvi, J., Salonen, A., Immonen, O., Garsed, K., Kelly, F.M., Zaitoun, A., Palva, A., Spiller, R.C., and de Vos, W.M. (2014). Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut* *63*, 1737–1745.
- Jarrett, M.E., Kohen, R., Cain, K.C., Burr, R.L., Poppe, A., Navaja, G.P., and Heitkemper, M.M. (2007). Relationship of SERT Polymorphisms to Depressive and Anxiety Symptoms in Irritable Bowel Syndrome. *Biol. Res. Nurs.* *9*, 161–169.
- Jeffery, I.B., O'Toole, P.W., Öhman, L., Claesson, M.J., Deane, J., Quigley, E.M.M., and Simrén, M. (2012). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* *61*, 997–1006.
- Jiang, J.B., and He, J.G. (1993). Taxonomic status of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Today* *9*, 2–3.
- Jiang, Y., Nie, Y., Li, Y., and Zhang, L. (2014). Association of cannabinoid type 1 receptor and fatty acid amide hydrolase genetic polymorphisms in Chinese patients with irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *29*, 1186–1191.
- Jimenez-Gonzalez, D.E., Martinez-Flores, W.A., Reyes-Gordillo, J., Ramirez-Miranda, M.E., Arroyo-Escalante, S., Romero-Valdovinos, M., Stark, D., Souza-Saldivar, V., Martinez-Hernandez, F., Flisser, A., et al. (2012). *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol. Res.* *110*, 1269–1275.
- Jiménez, J.C., Fontaine, J., Creusy, C., Fleurisse, L., Grzych, J.-M., Capron, M., and Dei-Cas, E. (2014). Antibody



- and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitol. Res.* *113*, 2709–2718.
- Jizhong, S., Qiaomin, W., Chao, W., and Yanqing, L. (2016). Corticotropin-Releasing Factor and Toll-Like Receptor Gene Expression Is Associated with Low-Grade Inflammation in Irritable Bowel Syndrome Patients with Depression. *Gastroenterol. Res. Pract.* *2016*, 7394924.
- Joć, E., Mađro, A., Celiński, K., Słomka, M., Kasztelan-Szczerbińska, B., Pacian, A., and Kulik, T. (2015). Quality of life of patients with irritable bowel syndrome before and after education. *Psychiatr. Pol.* *49*, 821–833.
- Johannesson, E., Simrén, M., Strid, H., Bajor, A., and Sadik, R. (2011). Physical Activity Improves Symptoms in Irritable Bowel Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *Am. J. Gastroenterol.* *106*, 915–922.
- Johannesson, E., Ringström, G., Abrahamsson, H., and Sadik, R. (2015). Intervention to increase physical activity in irritable bowel syndrome shows long-term positive effects. *World J. Gastroenterol.* *21*, 600.
- Johnsen, P.H., Hilpüsch, F., Cavanagh, J.P., Leikanger, I.S., Kolstad, C., Valle, P.C., and Goll, R. (2018). Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial. *Lancet. Gastroenterol. Hepatol.* *3*, 17–24.
- Johnson, A.C., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2016). The Pharmacology of Visceral Pain. In *Advances in Pharmacology* (San Diego, Calif.), pp. 273–301.
- Johnson, A.M., Thanou, A., Boreham, P.F., and Baverstock, P.R. (1989). *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Exp. Parasitol.* *68*, 283–288.
- Jones II, M.S., Ganac, R.D., Hiser, G., Hudson, N.R., Le, A., and Whipps, C.M. (2008). Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol. Res.* *103*, 551–557.
- De Jong, M.J., Korterink, J.J., Benninga, M.A., Hilbink, M., Widdershoven, J., and Deckers-Kocken, J.M. (2014). *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case-control study. *Arch. Dis. Child.* *99*, 1109–1113.
- Jun, S.-E., Kohen, R., Cain, K.C., Jarrett, M.E., and Heitkemper, M.M. (2014). TPH Gene Polymorphisms Are Associated With Disease Perception and Quality of Life in Women With Irritable Bowel Syndrome. *Biol. Res. Nurs.* *16*, 95–104.
- Jun, S., Kohen, R., Cain, K.C., Jarrett, M.E., and Heitkemper, M.M. (2011). Associations of tryptophan hydroxylase gene polymorphisms with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* *23*, 233-e116.
- Juruena, M.F. (2014). Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy Behav.* *38*, 148–159.
- Kabir, M.A., Ishaque, S.M., Ali, M.S., Mahmuduzzaman, M., and Hasan, M. (2011). Role of *Saccharomyces boulardii* in diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Mymensingh Med. J.* *20*, 397–401.
- Kanazawa, M., Palsson, O.S., Thiwan, S.I.M., Turner, M.J., van Tilburg, M.A.L., Gangarosa, L.M., Chitkara, D.K., Fukudo, S., Drossman, D.A., and Whitehead, W.E. (2008). Contributions of pain sensitivity and colonic motility to IBS symptom severity and predominant bowel habits. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 2550–2561.
- Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X., Tachibana, H., and Tsutsumi, Y. (2000). Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* *25*, 51–56.
- Kano, M., Muratsubaki, T., Van Oudenhove, L., Morishita, J., Yoshizawa, M., Kohno, K., Yagihashi, M., Tanaka, Y., Mugikura, S., Dupont, P., et al. (2017). Altered brain and gut responses to corticotropin-releasing hormone (CRH) in patients with irritable bowel syndrome. *Sci. Rep.* *7*, 12425.

- Kapeller, J., Houghton, L.A., Mönnikes, H., Walstab, J., Möller, D., Bönisch, H., Burwinkel, B., Autschbach, F., Funke, B., Lasitschka, F., et al. (2008). First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 2967–2977.
- Karasartova, D., Gureser, A.S., Zorlu, M., Turegun-Atasoy, B., Taylan-Ozkan, A., and Dolapci, M. (2016). Blastocystosis in post-traumatic splenectomized patients. *Parasitol. Int.* *65*, 802–805.
- Karling, P., Danielsson, Å., Wikgren, M., Söderström, I., Del-Favero, J., Adolfsson, R., and Norrback, K.-F. (2011). The relationship between the val158met catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and irritable bowel syndrome. *PLoS One* *6*, e18035.
- Karling, P., Wikgren, M., Adolfsson, R., and Norrback, K.-F. (2016). Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Hypersuppression Is Associated with Gastrointestinal Symptoms in Major Depression. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *22*, 292–303.
- Katiraei, P., and Bultron, G. (2011). Need for a comprehensive medical approach to the neuro-immuno-gastroenterology of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* *17*, 2791–2800.
- Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C.M., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, C., and Vakalis, N. (2008). Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm. Venereol.* *88*, 80–81.
- Katsumata, M., Yoshikawa, H., Tokoro, M., Mizuno, T., Nagamoto, T., Hendarto, J., Asih, P.B.S., Rozi, I.E., Kimata, I., Takami, K., et al. (2018). Molecular phylogeny of *Blastocystis* isolates from wild rodents captured in Indonesia and Japan. *Parasitol. Res.*
- Kaya, S., Cetin, E.S., Aridoğan, B.C., Arikan, S., and Demirci, M. (2007). Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazitoloji Derg.* *31*, 184–187.
- Kennedy, P.J., Clarke, G., Quigley, E.M.M., Groeger, J.A., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2012). Gut memories: towards a cognitive neurobiology of irritable bowel syndrome. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *36*, 310–340.
- Kennedy, P.J., Clarke, G., O'Neill, A., Groeger, J.A., Quigley, E.M.M., Shanahan, F., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2014a). Cognitive performance in irritable bowel syndrome: evidence of a stress-related impairment in visuospatial memory. *Psychol. Med.* *44*, 1553–1566.
- Kennedy, P.J., Cryan, J.F., Dinan, T.G., and Clarke, G. (2014b). Irritable bowel syndrome: A microbiome-gut-brain axis disorder? *World J. Gastroenterol.* *20*, 14105.
- Kerckhoffs, A.P.M., Samsom, M., van der Rest, M.E., de Vogel, J., Knol, J., Ben-Amor, K., and Akkermans, L.M.A. (2009). Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World J. Gastroenterol.* *15*, 2887–2892.
- Van Kerkhoven, L.A.S., Laheij, R.J.F., and Jansen, J.B.M.J. (2007). Meta-analysis: a functional polymorphism in the gene encoding for activity of the serotonin transporter protein is not associated with the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *26*, 979–986.
- Kim, G., Deepinder, F., Morales, W., Hwang, L., Weitsman, S., Chang, C., Gunsalus, R., and Pimentel, M. (2012). *Methanobrevibacter smithii* Is the Predominant Methanogen in Patients with Constipation-Predominant IBS and Methane on Breath. *Dig. Dis. Sci.* *57*, 3213–3218.
- Kim, H.J., Camilleri, M., Carlson, P.J., Cremonini, F., Ferber, I., Stephens, D., McKinzie, S., Zinsmeister, A.R., and Urrutia, R. (2004). Association of distinct alpha(2) adrenoceptor and serotonin transporter polymorphisms with constipation and somatic symptoms in functional gastrointestinal disorders. *Gut* *53*, 829–837.

- King, T.S., Elia, M., and Hunter, J.O. (1998). Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* (London, England) 352, 1187–1189.
- Klem, F., Wadhwa, A., Prokop, L.J., Sundt, W.J., Farrugia, G., Camilleri, M., Singh, S., and Grover, M. (2017). Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 152, 1042–1054.e1.
- Koçak, E., Akbal, E., Köklü, S., Ergül, B., and Can, M. (2016). The Colonic Tissue Levels of TLR2, TLR4 and Nitric Oxide in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Intern. Med.* 55, 1043–1048.
- Kolkhir, P., Balakirski, G., Merk, H.F., Olisova, O., and Maurer, M. (2016). Chronic spontaneous urticaria and internal parasites--a systematic review. *Allergy* 71, 308–322.
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C.M., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., et al. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19474–19479.
- Koo, H.L., and DuPont, H.L. (2010). Rifaximin: a unique gastrointestinal-selective antibiotic for enteric diseases. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 17–25.
- Kowalczyk, B.K., Smeets, H.M., Succop, P.A., De Wit, N.J., And Havelaar, A.H. (2014). Relative risk of irritable bowel syndrome following acute gastroenteritis and associated risk factors. *Epidemiol. Infect.* 142, 1259–1268.
- Krogsgaard, L.R., Engsbro, A.L., Stensvold, C.R., Nielsen, H.V., and 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, 507–513.e2.
- Krogsgaard, L.R., Engsbro, A.L., and Bytzer, P. (2018). Antibiotics: a risk factor for irritable bowel syndrome in a population-based cohort. *Scand. J. Gastroenterol.* 1–4.
- Krueger, D., Michel, K., Allam, S., Weiser, T., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Zeller, F., and Schemann, M. (2013). Effect of hyoscine butylbromide (Buscopan®) on cholinergic pathways in the human intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, e530–e539.
- Kruis, W., Chrubasik, S., Boehm, S., Stange, C., and Schulze, J. (2012). A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 467–474.
- Kulke, M.H., Hörsch, D., Caplin, M.E., Anthony, L.B., Bergsland, E., Öberg, K., Welin, S., Warner, R.R.P., Lombard-Bohas, C., Kunz, P.L., et al. (2017). Telotristat Ethyl, a Tryptophan Hydroxylase Inhibitor for the Treatment of Carcinoid Syndrome. *J. Clin. Oncol.* 35, 14–23.
- Kumar, S., Ranjan, P., Mittal, B., and Ghoshal, U.C. (2012). Serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphism in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 21, 31–38.
- Kumarasamy, V., Kuppusamy, U.R., Samudi, C., and Kumar, S. (2013). *Blastocystis* sp. subtype 3 triggers higher proliferation of human colorectal cancer cells, HCT116. *Parasitol. Res.* 112, 3551–3555.
- Kumarasamy, V., Roslani, A., Rani, K., and Kumar Govind, S. (2014). Advantage of using colonic washouts for *Blastocystis* detection in colorectal cancer patients. *Parasit. Vectors* 7, 162.
- Kumarasamy, V., Kuppusamy, U.R., Jayalakshmi, P., Samudi, C., Ragavan, N.D., and Kumar, S. (2017). Exacerbation of colon carcinogenesis by *Blastocystis* sp. *PLoS One* 12, e0183097.
- Kurniawan, A., Karyadi, T., Dwintasari, S.W., Sari, I.P., Yuniastuti, E., Djauzi, S., and Smith, H.V. (2009). Intestinal

- parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* *103*, 892–898.
- Labus, J.S., Hollister, E.B., Jacobs, J., Kirbach, K., Oezguen, N., Gupta, A., Acosta, J., Luna, R.A., Aagaard, K., Versalovic, J., et al. (2017). Differences in gut microbial composition correlate with regional brain volumes in irritable bowel syndrome. *Microbiome* *5*, 49.
- Lackner, J.M., and Gurtman, M.B. (2004). Pain catastrophizing and interpersonal problems: a circumplex analysis of the communal coping model. *Pain* *110*, 597–604.
- Lacy, B.E. (2016). Emerging treatments in neurogastroenterology: eluxadolone - a new therapeutic option for diarrhea-predominant IBS. *Neurogastroenterol. Motil.* *28*, 26–35.
- Lacy, B.E., and Moreau, J.C. (2016). Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: Diagnosis, etiology, and new treatment considerations. *J. Am. Assoc. Nurse Pract.* *28*, 393–404.
- Lacy, B.E., Mearin, F., Chang, L., Chey, W.D., Lembo, A.J., Simren, M., and Spiller, R. (2016). Bowel Disorders. *Gastroenterology* *150*, 1393–1407.e5.
- Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L., and Kagnoff, M.F. (1999). Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* *1*, 141–148.
- Lazaridis, N., and Germanidis, G. (2018). Current insights into the innate immune system dysfunction in irritable bowel syndrome. *Ann. Gastroenterol.* *31*, 171–187.
- Lee, Y.J., and Park, K.S. (2014). Irritable bowel syndrome: Emerging paradigm in pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* *20*, 2456.
- Lee, C., Doo, E., Choi, J.M., Jang, S.-H., Ryu, H.-S., Lee, J.Y., Oh, J.H., Park, J.H., Kim, Y.S., and Brain-Gut Axis Research Group of Korean Society of Neurogastroenterology and Motility (2017a). The Increased Level of Depression and Anxiety in Irritable Bowel Syndrome Patients Compared with Healthy Controls: Systematic Review and Meta-analysis. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *23*, 349–362.
- Lee, J.W., Park, J.H., Park, D.I.L., Park, J.-H., Kim, H.J., Cho, Y.K., Sohn, C.I.L., Jeon, W.K., and Kim, B.I. (2010). Subjects with diarrhea-predominant IBS have increased rectal permeability responsive to tryptase. *Dig. Dis. Sci.* *55*, 2922–2928.
- Lee, K.J., Kim, Y.B., Kim, J.H., Kwon, H.C., Kim, D.K., and Cho, S.W. (2008). The alteration of enterochromaffin cell, mast cell, and lamina propria T lymphocyte numbers in irritable bowel syndrome and its relationship with psychological factors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *23*, 1689–1694.
- Lee, K.N., Lee, O.Y., Choi, M.-G., Sohn, C. Il, Huh, K.C., Park, K.S., Kwon, J.G., Kim, N., Rhee, P.-L., Myung, S.-J., et al. (2014a). Efficacy and Safety of Tiropramide in the Treatment of Patients With Irritable Bowel Syndrome: A Multicenter, Randomized, Double-blind, Non-inferiority Trial, Compared With Octylonium. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *20*, 113–121.
- 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., et al. (2014b). Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *8*, e2880.
- Lee, Y.Y., Annamalai, C., and Rao, S.S.C. (2017b). Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *19*, 56.
- Leelayoova, S., Taamasri, P., Rangsri, R., Naaglor, T., Thathaisong, U., and Mungthin, M. (2002). In-vitro

- cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* *96*, 803–807.
- Lembo, A., Pimentel, M., Rao, S.S., Schoenfeld, P., Cash, B., Weinstock, L.B., Paterson, C., Bortey, E., and Forbes, W.P. (2016a). Repeat Treatment With Rifaximin Is Safe and Effective in Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *151*, 1113–1121.
- Lembo, A.J., Schneier, H.A., Shiff, S.J., Kurtz, C.B., MacDougall, J.E., Jia, X.D., Shao, J.Z., Lavins, B.J., Currie, M.G., Fitch, D.A., et al. (2011). Two Randomized Trials of Linaclotide for Chronic Constipation. *N. Engl. J. Med.* *365*, 527–536.
- Lembo, A.J., Lacy, B.E., Zuckerman, M.J., Schey, R., Dove, L.S., Andrae, D.A., Davenport, J.M., McIntyre, G., Lopez, R., Turner, L., et al. (2016b). Eluxadoline for Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea. *N. Engl. J. Med.* *374*, 242–253.
- Lembo, A., Zaman, M., Jones, M., And Talley, N.J. (2007). Influence of genetics on irritable bowel syndrome, gastro-oesophageal reflux and dyspepsia: a twin study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *25*, 1343–1350.
- Lepczyńska, M., Białkowska, J., Dzika, E., Piskorz-Ogórek, K., and Korycińska, J. (2017). *Blastocystis*: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *36*, 1531–1540.
- Levy, R.L., Jones, K.R., Whitehead, W.E., Feld, S.I., Talley, N.J., and Corey, L.A. (2001). Irritable bowel syndrome in twins: heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology* *121*, 799–804.
- Levy, R.L., Olden, K.W., Naliboff, B.D., Bradley, L.A., Francisconi, C., Drossman, D.A., and Creed, F. (2006). Psychosocial Aspects of the Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* *130*, 1447–1458.
- Li, J., Deng, T., Li, X., Cao, G., Li, X., and Yan, Y. (2013). A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitol. Res.* *112*, 3537–3541.
- 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., et al. (2007). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol. Int.* *56*, 281–286.
- Li, P., Spolski, R., Liao, W., and Leonard, W.J. (2014). Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells. *Immunol. Rev.* *261*, 141–156.
- Ligaarden, S.C., Axelsson, L., Naterstad, K., Lydersen, S., and Farup, P.G. (2010). A candidate probiotic with unfavourable effects in subjects with irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *BMC Gastroenterol.* *10*, 16.
- Lim, M.X., Png, C.W., Tay, C.Y.B., Teo, J.D.W., Jiao, H., Lehming, N., Tan, K.S.W., and Zhang, Y. (2014). Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infect. Immun.* *82*, 4789–4801.
- Litleskare, S., Rortveit, G., Eide, G.E., Hanevik, K., Langeland, N., and Wensaas, K.-A. (2018). Prevalence of Irritable Bowel Syndrome and Chronic Fatigue 10 Years After *Giardia* Infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 1064–1072.e4.
- Liu, J.J., Kay, T.M., Davis, E.M., Lou, Y., Kao, D., Claggett, B., Fedorak, R.N., and Irvin, R.T. (2016). Epithelial Cell Extrusion Zones Observed on Confocal Laser Endomicroscopy Correlates with Immunohistochemical Staining of Mucosal Biopsy Samples. *Dig. Dis. Sci.* *61*, 1895–1902.

- Long, H.Y., Handschack, A., König, W., and Ambrosch, A. (2001). *Blastocystis* hominis modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitol. Res.* 87, 1029–1030.
- Longstreth, G.F., Thompson, W.G., Chey, W.D., Houghton, L.A., Mearin, F., and Spiller, R.C. (2006). Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 130, 1480–1491.
- Lopes, J.P., Stylianou, M., Nilsson, G., and Urban, C.F. (2015). Opportunistic pathogen *Candida albicans* elicits a temporal response in primary human mast cells. *Sci. Rep.* 5, 12287.
- Lovell, R.M., and Ford, A.C. (2012). Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 712–721.e4.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230.
- Lyra, A., Rinttilä, T., Nikkilä, J., Krogius-Kurikka, L., Kajander, K., Malinen, E., Mättö, J., Mäkelä, L., and Palva, A. (2009). Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification. *World J. Gastroenterol.* 15, 5936–5945.
- Mahmoud, M.S.E., and Saleh, W.A. (2003). Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 33, 13–30.
- Malinen, E., Rinttilä, T., Kajander, K., Matto, J., Kassinen, A., Krogius, L., Saarela, M., Korpela, R., and Palva, A. (2005). Analysis of the Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients and Healthy Controls with Real-Time PCR. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 373–382.
- Mangel, A., and Hicks, G.A. (2012). Asimadoline and its potential for the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a review. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 5, 1.
- Martin-Viñas, J.J., and Quigley, E.M.M. (2016). Immune response in irritable bowel syndrome: A systematic review of systemic and mucosal inflammatory mediators. *J. Dig. Dis.* 17, 572–581.
- Martínez, C., Vicario, M., Ramos, L., Lobo, B., Mosquera, J.L., Alonso, C., Sánchez, A., Guilarte, M., Antolín, M., de Torres, I., et al. (2012). The jejunum of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome shows molecular alterations in the tight junction signaling pathway that are associated with mucosal pathobiology and clinical manifestations. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 736–746.
- Martínez, C., Lobo, B., Pigrau, M., Ramos, L., González-Castro, A.M., Alonso, C., Guilarte, M., Guilá, M., de Torres, I., Azpiroz, F., et al. (2013). Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut* 62, 1160–1168.
- Martínez, C., Rodiño-Janeiro, B.K., Lobo, B., Stanifer, M.L., Klaus, B., Granzow, M., González-Castro, A.M., Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., Pigrau, M., et al. (2017). miR-16 and miR-125b are involved in barrier function dysregulation through the modulation of claudin-2 and cingulin expression in the jejunum in IBS with diarrhoea. *Gut* 66, 1537.1-1538.
- Mayer, E.A., Labus, J.S., Tillisch, K., Cole, S.W., and Baldi, P. (2015). Towards a systems view of IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 592–605.
- McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., Turecki, G., and Meaney, M.J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat. Neurosci.* 12, 342–348.
- McKernan, D.P., Gaszner, G., Quigley, E.M., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011). Altered peripheral toll-like

- receptor responses in the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 33, 1045–1052.
- Mego, M., Manichanh, C., Accarino, A., Campos, D., Pozuelo, M., Varela, E., Vulevic, J., Tzortzis, G., Gibson, G., Guarner, F., et al. (2017). Metabolic adaptation of colonic microbiota to galactooligosaccharides: a proof-of-concept-study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 45, 670–680.
- Meleine, M., and Matricon, J. (2014). Gender-related differences in irritable bowel syndrome: potential mechanisms of sex hormones. *World J. Gastroenterol.* 20, 6725–6743.
- Meloni, D., Poirier, P., Mantini, C., Noël, C., Gantois, N., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Chabé, M., Delhaes, L., Dei-Cas, E., et al. (2012). Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. *Parasitol. Int.* 61, 719–722.
- Mertz, H., Naliboff, B., Munakata, J., Niazi, N., and Mayer, E.A. (1995). Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 109, 40–52.
- Min, Y.W., Park, S.U., Jang, Y.S., Kim, Y.-H., Rhee, P.-L., Ko, S.H., Joo, N., Kim, S.I., Kim, C.-H., and Chang, D.K. (2012). Effect of composite yogurt enriched with acacia fiber and *Bifidobacterium lactis*. *World J. Gastroenterol.* 18, 4563–4569.
- Mirjalali, H., Abbasi, M.R., Naderi, N., Hasani, Z., Mirsamadi, E.S., Stensvold, C.R., Balaii, H., Asadzadeh Aghdaei, H., and Zali, M.R. (2017). Distribution and phylogenetic analysis of *Blastocystis* sp. subtypes isolated from IBD patients and healthy individuals in Iran. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 2335–2342.
- Mirza, H., Wu, Z., Kidwai, F., and Tan, K.S.W. (2011). 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.* 79, 5019–5026.
- Mirza, H., Wu, Z., Teo, J.D.W., and Tan, K.S.W. (2012). Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cell. Microbiol.* 14, 1474–1484.
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Chen, X.Q., and Yap, E.H. (1996). Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol. Res.* 82, 439–444.
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1997). Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol. Res.* 83, 319–325.
- Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., and Yap, E.H. (1999). Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms *in vitro*. *Parasitol. Res.* 85, 103–108.
- Mohamed, A.M., Ahmed, M.A., Ahmed, S.A., Al-Semany, S.A., Alghamdi, S.S., and Zagloul, D.A. (2017). Predominance and association risk of *Blastocystis hominis* subtype I in colorectal cancer: a case control study. *Infect. Agent. Cancer* 12, 21.
- Moret, C., and Briley, M. (2006). Antidepressants in the treatment of fibromyalgia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2, 537–548.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D.B., Budni, J., de Freitas, A.E., Farina, M., and Severo Rodrigues, A.L. (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J. Psychiatr. Res.* 46, 331–340.
- Mulak, A., Waszczuk, E., Beszlej, J.A., Szechinski, M., Frydecka, D., Szewczuk-Boguslawska, M., and Grzesiak, M. (2013). Mo2040 Association of Polymorphisms in 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> Receptors Genes With Depressive and

- Anxiety Disorders in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 144, S-725.
- Murakami, K., Habukawa, C., Nobuta, Y., Moriguchi, N., and Takemura, T. (2012). The effect of *Lactobacillus brevis* KB290 against irritable bowel syndrome: a placebo-controlled double-blind crossover trial. *Biopsychosoc. Med.* 6, 16.
- Nagel, R., Traub, R.J., Kwan, M.M.S., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2015). *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasit. Vectors* 8, 453.
- Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2016). Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front. Immunol.* 7, 175.
- Nakao, J.H., Collier, S.A., and Gargano, J.W. (2017). Giardiasis and Subsequent Irritable Bowel Syndrome: A Longitudinal Cohort Study Using Health Insurance Data. *J. Infect. Dis.* 215, 798–805.
- Nash, A.K., Auchtung, T.A., Wong, M.C., Smith, D.P., Gesell, J.R., Ross, M.C., Stewart, C.J., Metcalf, G.A., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., et al. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5, 153.
- Neish, A.S. (2009). Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology* 136, 65–80.
- Le Nevé, B., Posserud, I., Böhn, L., Guyonnet, D., Rondeau, P., Tillisch, K., Naliboff, B., Mayer, E.A., and Simrén, M. (2013). A combined nutrient and lactulose challenge test allows symptom-based clustering of patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 786–795.
- Niec, A.M., Frankum, B., and Talley, N.J. (1998). Are adverse food reactions linked to irritable bowel syndrome? *Am. J. Gastroenterol.* 93, 2184–2190.
- Niedzielin, K., Kordecki, H., and Birkenfeld, B. (2001). A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 1143–1147.
- Nielsen, H.L., Engberg, J., Ejlersen, T., and Nielsen, H. (2014). Psychometric scores and persistence of irritable bowel after *Campylobacter concisus* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 545–551.
- Niesler, B., Kapeller, J., Fell, C., Atkinson, W., Möller, D., Fischer, C., Whorwell, P., and Houghton, L.A. (2010). 5-HTTLPR and STin2 polymorphisms in the serotonin transporter gene and irritable bowel syndrome: effect of bowel habit and sex. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 856–861.
- Nieto-Patlán, A., Campillo-Navarro, M., Rodríguez-Cortés, O., Muñoz-Cruz, S., Wong-Baeza, I., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., Serafín-López, J., and Chacón-Salinas, R. (2015). Recognition of *Candida albicans* by Dectin-1 induces mast cell activation. *Immunobiology* 220, 1093–1100.
- Nieves-Ramírez, M.E., Partida-Rodríguez, O., Laforest-Lapointe, I., Reynolds, L.A., Brown, E.M., Valdez-Salazar, A., Morán-Silva, P., Rojas-Velázquez, L., Morien, E., Parfrey, L.W., et al. (2018). Asymptomatic Intestinal Colonization with Protist *Blastocystis* Is Strongly Associated with Distinct Microbiome Ecological Patterns. *MSystems* 3.
- Niv, E., Naftali, T., Hallak, R., and Vaisman, N. (2005). The efficacy of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the treatment of patients with irritable bowel syndrome--a double blind, placebo-controlled, randomized study. *Clin. Nutr.* 24, 925–931.
- Nobaek, S., Johansson, M.L., Molin, G., Ahrné, S., and Jeppsson, B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J.*



Gastroenterol. 95, 1231–1238.

Noel, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.-C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., et al. (2005). Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 348–355.

Norlin, A.-K., Walter, S., Theodorsson, E., Tegelstrom, V., Grodzinsky, E., Jones, M.P., and Faresjö, Å. (2017). Cortisol levels in hair are altered in irritable bowel syndrome - A case control study in primary care. *J. Psychosom. Res.* 93, 69–75.

Nourrisson, C., Scanzi, J., Pereira, B., NkoudMongo, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Viscogliosi, E., Livrelli, V., Delbac, F., Dapoigny, M., et al. (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.

Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Livrelli, V., Viscogliosi, E., Delbac, F., And Poirier, P. (2016). On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology* 143, 1713–1722.

O'Brien Andersen, L., Karim, A.B., Roager, H.M., Vignsnaes, L.K., Kroghfelt, K.A., Licht, T.R., and Stensvold, C.R. (2016). Associations between common intestinal parasites and bacteria in humans as revealed by qPCR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1427–1431.

O'Keefe, M., Jansen, C., Martin, L., Williams, M., Seamark, L., Staudacher, H.M., Irving, P.M., Whelan, K., and Lomer, M.C. (2018). Long-term impact of the low-FODMAP diet on gastrointestinal symptoms, dietary intake, patient acceptability, and healthcare utilization in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 30, e13154.

O'Sullivan, M.A., and O'Morain, C.A. (2000). Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomised double-blind placebo-controlled crossover study. *Dig. Liver Dis.* 32, 294–301.

O'Sullivan, M., Clayton, N., Breslin, N.P., Harman, I., Bountra, C., McLaren, A., and O'Morain, C.A. (2000). Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 12, 449–457.

Ohman, L., and Simrén, M. (2010). Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 163–173.

Ohman, L., Lindmark, A.-C., Isaksson, S., Posserud, I., Strid, H., Sjövall, H., and Simrén, M. (2012). Increased TLR2 expression on blood monocytes in irritable bowel syndrome patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 398–405.

Olafsdottir, L.B., Gudjonsson, H., Jonsdottir, H.H., and Thjodleifsson, B. (2010). Stability of the irritable bowel syndrome and subgroups as measured by three diagnostic criteria - a 10-year follow-up study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 32, 670–680.

Olivos, A., Ramos, E., Nequiz, M., Barba, C., Tello, E., Castañón, G., González, A., Martínez, R.D., Montfort, I., and Pérez-Tamayo, R. (2005). *Entamoeba histolytica*: mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. *Exp. Parasitol.* 110, 309–312.

Olsen, K.E.P., Christiansen, D.B., Nielsen, H.V., and Stensvold, C.R. (2011). *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 883–885.

Ortega, Y.R., and Adam, R.D. (1997). *Giardia*: overview and update. *Clin. Infect. Dis.* 25, 545–9; quiz 550.

Oświecimska, J., Szymłak, A., Roczniak, W., Girczys-Połedniok, K., and Kwiecień, J. (2017). New insights into the pathogenesis and treatment of irritable bowel syndrome. *Adv. Med. Sci.* 62, 17–30.

- Ozol, D., Uz, E., Bozalan, R., Türkyay, C., and Yildirim, Z. (2006). Relationship Between Asthma and Irritable Bowel Syndrome: Role of Food Allergy. *J. Asthma* 43, 773–775.
- Pace, F., Pace, M., and Quartarone, G. (2015). Probiotics in digestive diseases: focus on *Lactobacillus* GG. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 61, 273–292.
- Padukone, S., Mandal, J., and Parija, S.C. (2017). Severe *Blastocystis* subtype 3 infection in a patient with colorectal cancer. *Trop. Parasitol.* 7, 122–124.
- Paineau, D., Payen, F., Panserieu, S., Coulombier, G., Sobaszek, A., Lartigau, I., Brabet, M., Galmiche, J.-P., Tripodi, D., Sacher-Huvelin, S., et al. (2008). The effects of regular consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on digestive comfort of subjects with minor functional bowel disorders. *Br. J. Nutr.* 99, 311–318.
- Pajak, R., Lackner, J., and Kamboj, S.K. (2013). A systematic review of minimal-contact psychological treatments for symptom management in irritable bowel syndrome. *J. Psychosom. Res.* 75, 103–112.
- Parija, S.C., and Jeremiah, S. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop. Parasitol.* 3, 17–25.
- Park, J.H., Rhee, P.-L., Kim, H.S., Lee, J.H., Kim, Y.-H., Kim, J.J., and Rhee, J.C. (2006). Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 71–78.
- Park, J.M., Choi, M.-G., Cho, Y.K., Lee, I.S., Kim, S.W., Choi, K.Y., and Chung, I.-S. (2011). Cannabinoid receptor 1 gene polymorphism and irritable bowel syndrome in the Korean population: a hypothesis-generating study. *J. Clin. Gastroenterol.* 45, 45–49.
- Parkar, U., Traub, R.J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., Morris, K., And Thompson, R.C.A. (2007). Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 134, 359.
- Parkes, G.C., Rayment, N.B., Hudspith, B.N., Petrovska, L., Lomer, M.C., Brostoff, J., Whelan, K., and Sanderson, J.D. (2012). Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 31–39.
- Parry, S.D., Stansfield, R., Jelley, D., Gregory, W., Phillips, E., Barton, J.R., and Welfare, M.R. (2003). Does bacterial gastroenteritis predispose people to functional gastrointestinal disorders? A prospective, community-based, case-control study. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 1970–1975.
- Pasqui, A.L., Savini, E., Saletti, M., Guzzo, C., Puccetti, L., and Auteri, A. Chronic urticaria and *Blastocystis* hominis infection: a case report. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 8, 117–120.
- Paula, H., Grover, M., Halder, S.L., Locke, G.R., Schleck, C.D., Zinsmeister, A.R., Talley, N.J., and Talley, N.J. (2015). Non-enteric infections, antibiotic use, and risk of development of functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 1580–1586.
- Pavanelli, M.F., Kaneshima, E.N., Uda, C.F., Colli, C.M., Falavigna-Guilherm, A.L., and 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. Sao Paulo* 57, 467–472.
- Pei, L., Chen, H., Guo, J., Chen, L., Wu, X., Xu, W., Weng, S., Yang, E., Hammer, T., and Sun, J. (2018). Effect of acupuncture and its influence on visceral hypersensitivity in IBS-D patients. *Medicine (Baltimore)*. 97, e10877.
- Pellissier, S., and Bonaz, B. (2017). The Place of Stress and Emotions in the Irritable Bowel Syndrome. In *Vitamins and Hormones*, pp. 327–354.

- Piche, T., Saint-Paul, M.C., Dainese, R., Marine-Barjoan, E., Iannelli, A., Montoya, M.L., Peyron, J.F., Czerucka, D., Cherikh, F., Filippi, J., et al. (2008). Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome. *Gut* 57, 468–473.
- Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J.L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galimiche, J.P., et al. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 58, 196–201.
- Pimentel, M., Chow, E.J., and Lin, H.C. (2000). Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 3503–3506.
- Pimentel, M., Chow, E.J., and Lin, H.C. (2003). Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome. a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Gastroenterol.* 98, 412–419.
- Pimentel, M., Park, S., Mirocha, J., Kane, S. V, and Kong, Y. (2006a). The effect of a nonabsorbed oral antibiotic (rifaximin) on the symptoms of the irritable bowel syndrome: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 145, 557–563.
- Pimentel, M., Lin, H.C., Enayati, P., van den Burg, B., Lee, H.-R., Chen, J.H., Park, S., Kong, Y., and Conklin, J. (2006b). Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1089-95.
- Pimentel, M., Lembo, A., Chey, W.D., Zakko, S., Ringel, Y., Yu, J., Mareya, S.M., Shaw, A.L., Bortey, E., Forbes, W.P., et al. (2011). Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation. *N. Engl. J. Med.* 364, 22–32.
- Pimentel, M., Cash, B.D., Lembo, A., Wolf, R.A., Israel, R.J., and Schoenfeld, P. (2017). Erratum to: Repeat Rifaximin for Irritable Bowel Syndrome: No Clinically Significant Changes in Stool Microbial Antibiotic Sensitivity. *Dig. Dis. Sci.* 62, 2945–2945.
- Pineiro, M., Asp, N.-G., Reid, G., Macfarlane, S., Morelli, L., Brunser, O., and Tuohy, K. (2008). FAO Technical meeting on prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 42 *Suppl 3 Pt 2*, S156-9.
- Pineton de Chambrun, G., Neut, C., Chau, A., Cazaubiel, M., Pelerin, F., Justen, P., and Desreumaux, P. (2015). A randomized clinical trial of *Saccharomyces cerevisiae* versus placebo in the irritable bowel syndrome. *Dig. Liver Dis.* 47, 119–124.
- Pinn, D.M., Aroniadis, O.C., and Brandt, L.J. (2015). Is fecal microbiota transplantation (FMT) an effective treatment for patients with functional gastrointestinal disorders (FGID)? *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 19–29.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., and 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, 975–983.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C.P., Delbac, F., and El Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8, 1–4.
- Ponnusamy, K., Choi, J.N., Kim, J., Lee, S.-Y., and Lee, C.H. (2011). Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *J. Med. Microbiol.* 60, 817–827.
- Porter, C.K., Faix, D.J., Shiao, D., Espiritu, J., Espinosa, B.J., and Riddle, M.S. (2012). Postinfectious gastrointestinal disorders following norovirus outbreaks. *Clin. Infect. Dis.* 55, 915–922.
- Posserud, I., Syrous, A., Lindström, L., Tack, J., Abrahamsson, H., and Simrén, M. (2007). Altered Rectal

- Perception in Irritable Bowel Syndrome Is Associated With Symptom Severity. *Gastroenterology* 133, 1113–1123.
- Posserud, I., Strid, H., Störsrud, S., Törnblom, H., Svensson, U., Tack, J., Van Oudenhove, L., and Simrén, M. (2013). Symptom pattern following a meal challenge test in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *United Eur. Gastroenterol. J.* 1, 358–367.
- Poulsen, C.S., and Stensvold, C.R. (2016). Systematic review on *Endolimax nana*: A less well studied intestinal ameba. *Trop. Parasitol.* 6, 8–29.
- Pourmand, H., and Esmailzadeh, A. (2017). Consumption of a Low Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides, and Polyols Diet and Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review. *Int. J. Prev. Med.* 8, 104.
- Pozuelo, M., Panda, S., Santiago, A., Mendez, S., Accarino, A., Santos, J., Guarner, F., Azpiroz, F., and Manichanh, C. (2015). Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci. Rep.* 5, 12693.
- Pritchard, S.E., Marciani, L., Garsed, K.C., Hoad, C.L., Thongborisute, W., Roberts, E., Gowland, P.A., and Spiller, R.C. (2014). Fasting and postprandial volumes of the undisturbed colon: normal values and changes in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome measured using serial MRI. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 124–130.
- Puthia, M.K., Vaithilingam, A., Lu, J., and Tan, K.S.W. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol. Res.* 97, 386–389.
- Puthia, M.K., Sio, S.W.S., Lu, J., and Tan, K.S.W. (2006). *Blastocystis ratti* Induces Contact-Independent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. *Infect. Immun.* 74, 4114–4123.
- Puthia, M.K., Lu, J., and Tan, K.S.W. (2008). *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryot. Cell* 7, 435–443.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- Qiu, X., Zhang, F., Yang, X., Wu, N., Jiang, W., Li, X., Li, X., and Liu, Y. (2015). Changes in the composition of intestinal fungi and their role in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Sci. Rep.* 5, 10416.
- Ragavan, N.D., Kumar, S., Chye, T.T., Mahadeva, S., and Shiao-Hooi, H. (2015). *Blastocystis* sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS) - Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy. *PLoS One* 10, e0121173.
- Rajilić-Stojanović, M., and de Vos, W.M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 996–1047.
- Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H.G.H.J., Kajander, K., Kekkonen, R.A., Tims, S., and de Vos, W.M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 141, 1792–1801.
- Rajindrajith, S., and Devanarayana, N.M. (2012). Subtypes and Symptomatology of Irritable Bowel Syndrome in Children and Adolescents: A School-based Survey Using Rome III Criteria. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 18, 298–304.
- Ramirez-Miranda, M., Hernandez-Castellanos, R., Lopez-Escamilla, E., Moncada, D., Rodriguez-Magallan, A., Pagaza-Melero, C., Gonzalez-Angulo, A., Flisser, A., Kawa-Karasik, S., and Maravilla, P. (2010). Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *Parasit. Vectors* 3, 96.
- Ramírez, J.D., Sánchez, L.V., Bautista, D.C., Corredor, A.F., Flórez, A.C., and Stensvold, C.R. (2014). *Blastocystis*

- subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect. Genet. Evol.* *22*, 223–228.
- Ramírez, J.D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M.C., Giraldo, J.C., Reyes, P., López, M.C., García, L., Cooper, P.J., et al. (2016). Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infect. Genet. Evol.* *41*, 32–35.
- Ramírez, J.D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M.C., and Giraldo, J.C. (2017). *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One* *12*, e0172586.
- Ranasinghe, N., Devanarayana, N.M., Rajindrajith, S., Perera, M.S., Nishanthinie, S., Warnakulasuriya, T., and de Zoysa, P.T. (2018). Functional gastrointestinal diseases and psychological maladjustment, personality traits and quality of life. *BMC Gastroenterol.* *18*, 33.
- Rao, K., Sekar, U., Iraivan, K.T., Abraham, G., and Soundararajan, P. (2003). *Blastocystis hominis*--an emerging cause of diarrhoea in renal transplant recipients. *J. Assoc. Physicians India* *51*, 719–721.
- Rao, S., Lembo, A.J., Shiff, S.J., Lavins, B.J., Currie, M.G., Jia, X.D., Shi, K., MacDougall, J.E., Shao, J.Z., Eng, P., et al. (2012). A 12-week, randomized, controlled trial with a 4-week randomized withdrawal period to evaluate the efficacy and safety of linaclotide in irritable bowel syndrome with constipation. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 1714–24; quiz p.1725.
- Rasti, S., Hassanzadeh, M., Hooshyar, H., Momen-Heravi, M., Mousavi, S.G.A., and Abdoli, A. (2017). Intestinal parasitic infections in different groups of immunocompromised patients in Kashan and Qom cities, central Iran. *Scand. J. Gastroenterol.* *52*, 738–741.
- Rene, B.A., Stensvold, C.R., Badsberg, J.H., and Nielsen, H. V (2009). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *80*, 588–592.
- Rezaie, A., Nikfar, S., and Abdollahi, M. (2010). The place of antibiotics in management of irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Med. Sci.* *6*, 49–55.
- Richard, M.L., Lamas, B., Liguori, G., Hoffmann, T.W., and Sokol, H. (2015). Gut fungal microbiota: the Yin and Yang of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* *21*, 656–665.
- Rigsbee, L., Agans, R., Shankar, V., Kenche, H., Khamis, H.J., Michail, S., and Paliy, O. (2012). Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *107*, 1740–1751.
- Ringel-Scaia, V.M., McDaniel, D.K., and Allen, I.C. (2016). The Goldilocks Conundrum: NLR Inflammasome Modulation of Gastrointestinal Inflammation during Inflammatory Bowel Disease. *Crit. Rev. Immunol.* *36*, 283–314.
- Ringel, Y., and Ringel-Kulka, T. (2015). The Intestinal Microbiota and Irritable Bowel Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* *49*, S56–S59.
- Ritchie, J. (1973). Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* *14*, 125–132.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* *104*, S1–S63.
- Rodiño-Janeiro, B.K., Vicario, M., Alonso-Cotoner, C., Pascua-García, R., and Santos, J. (2018). A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv. Ther.* *35*, 289–310.
- Rogha, M., Esfahani, M.Z., and Zargarzadeh, A.H. (2014). The efficacy of a synbiotic containing *Bacillus Coagulans*

in treatment of irritable bowel syndrome: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench* 7, 156–163.

Róka, R., Rosztóczy, A., Leveque, M., Izbéki, F., Nagy, F., Molnár, T., Lonovics, J., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., Wittmann, T., et al. (2007). A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 550–555.

Roohafza, H., Bidaki, E., Hasanzadeh-Keshteli, A., Daghighzade, H., Afshar, H., and Adibi, P. (2016). Anxiety, depression and distress among irritable bowel syndrome and their subtypes: An epidemiological population based study. *Adv. Biomed. Res.* 5, 183.

Rooks, M.G., and Garrett, W.S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 341–352.

Rosa, P.B., Ribeiro, C.M., Bettio, L.E.B., Colla, A., Lieberknecht, V., Moretti, M., and Rodrigues, A.L.S. (2014). Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 127, 1–6.

Röser, D., Simonsen, J., Stensvold, C.R., Olsen, K.E.P., Bytzer, P., Nielsen, H. V., and Mølbak, K. (2014). Metronidazole Therapy for Treating Dientamoebiasis in Children Is Not Associated With Better Clinical Outcomes: A Randomized, Double-Blinded and Placebo-Controlled Clinical Trial. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1692–1699.

Rossen, N.G., Bart, A., Verhaar, N., van Nood, E., Kootte, R., de Groot, P.F., D'Haens, G.R., Ponsioen, C.Y., and van Gool, T. (2015). Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 1039–1044.

Rostami, A., Riahi, S.M., Haghighi, A., Saber, V., Armon, B., and Seyyedtabaei, S.J. (2017). Erratum to: the role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol. Res.* 116, 2611–2612.

Ruepert, L., Quartero, A.O., de Wit, N.J., van der Heijden, G.J., Rubin, G., and Muris, J.W. (2011). Bulking agents, antispasmodics and antidepressants for the treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003460.

Růžková, J., Květoňová, D., Jirků, M., Lhotská, Z., Stensvold, C.R., Parfrey, L.W., and Jirků Pomajbíková, K. (2018). Evaluating rodent experimental models for studies of *Blastocystis* ST1. *Exp. Parasitol.* 191, 55–61.

El Safadi, D., Meloni, D., Poirier, P., Osman, M., Cian, A., Gaayeb, L., Wawrzyniak, I., Delbac, F., El Alaoui, H., Delhaes, L., 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.

Saha, L. (2014). Irritable bowel syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World J. Gastroenterol.* 20, 6759.

Saito, Y.A. (2008). Genes and irritable bowel syndrome: is there a link? *Curr. Gastroenterol. Rep.* 10, 355–362.

Saito, Y.A. (2011). The Role of Genetics in IBS. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 40, 45–67.

Saito, Y.A., and Talley, N.J. (2008). Genetics of Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2100–2104.

Saito, Y.A., Strega, P.R., Tester, D.J., Locke, G.R., Talley, N.J., Bernard, C.E., Rae, J.L., Makielski, J.C., Ackerman, M.J., and Farrugia, G. (2009). Sodium channel mutation in irritable bowel syndrome: evidence for an ion channelopathy. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 296, G211–G218.

Salvador, F., Sulleiro, E., Sánchez-Montalvá, A., Alonso, C., Santos, J., Fuentes, I., and Molina, I. (2016).

- Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis* sp. infection in Barcelona, Spain. *Parasit. Vectors* 9, 548.
- Saneian, H., Pourmoghaddas, Z., Roohafza, H., and Gholamrezaei, A. (2015). Synbiotic containing *Bacillus coagulans* and fructo-oligosaccharides for functional abdominal pain in children. *Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench* 8, 56–65.
- Santos, H.J., and Rivera, W.L. (2009). Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis hominis* in sera and intestinal secretions of orally infected mice. *Parasitol. Res.* 105, 1303–1310.
- Saulnier, D.M., Riehle, K., Mistretta, T.-A., Diaz, M.-A., Mandal, D., Raza, S., Weidler, E.M., Qin, X., Coarfa, C., Milosavljevic, A., et al. (2011). Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 141, 1782–1791.
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., and Cotter, P.D. (2015). 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.* 81, 4071–4076.
- Schmulson, M.J., and Drossman, D.A. (2017). What Is New in Rome IV. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 23, 151–163.
- Schoenfeld, P., Pimentel, M., Chang, L., Lembo, A., Chey, W.D., Yu, J., Paterson, C., Bortey, E., and Forbes, W.P. (2014). Safety and tolerability of rifaximin for the treatment of irritable bowel syndrome without constipation: a pooled analysis of randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 39, 1161–1168.
- Schroeder, F.A., Lin, C.L., Crusio, W.E., and Akbarian, S. (2007). Antidepressant-Like Effects of the Histone Deacetylase Inhibitor, Sodium Butyrate, in the Mouse. *Biol. Psychiatry* 62, 55–64.
- Schumann, D., Klose, P., Lauche, R., Dobos, G., Langhorst, J., and Cramer, H. (2018). Low fermentable, oligo-, di-, mono-saccharides and polyol diet in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 45, 24–31.
- Schwarzer, D., and Marahiel, M.A. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* 88, 93–101.
- Scicluna, S.M., Tawari, B., and Clark, C.G. (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist* 157, 77–85.
- Sen, S., Mullan, M.M., Parker, T.J., Woolner, J.T., Tarry, S.A., and Hunter, J.O. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2615–2620.
- Shah, E., Rezaie, A., Riddle, M., and Pimentel, M. (2014). Psychological disorders in gastrointestinal disease: epiphenomenon, cause or consequence? *Ann. Gastroenterol.* 27, 224–230.
- Shah, M., Tan, C.B., Rajan, D., Ahmed, S., Subramani, K., Rizvon, K., and Mustacchia, P. (2012). ***Blastocystis hominis*** and ***Endolimax nana*** Co-Infection Resulting in Chronic Diarrhea in an Immunocompetent Male. *Case Rep. Gastroenterol.* 6, 358–364.
- Sharara, A.I., Aoun, E., Abdul-Baki, H., Mounzer, R., Sidani, S., and ElHajj, I. (2006). A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Rifaximin in Patients with Abdominal Bloating and Flatulence. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 326–333.
- Shepherd, S.J., Parker, F.C., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2008). Dietary triggers of abdominal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: randomized placebo-controlled evidence. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 765–771.
- Shulman, R.J., Jarrett, M.E., Cain, K.C., Broussard, E.K., and Heitkemper, M.M. (2014). Associations among gut

- permeability, inflammatory markers, and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol.* *49*, 1467–1476.
- Sikander, A., Rana, S.V., Sharma, S.K., Sinha, S.K., Arora, S.K., Prasad, K.K., and Singh, K. (2010). Association of alpha 2A adrenergic receptor gene (ADRA $\alpha$ 2A) polymorphism with irritable bowel syndrome, microscopic and ulcerative colitis. *Clin. Chim. Acta.* *411*, 59–63.
- Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., and Clark, C.G. (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature* *380*, 398–398.
- Simrén, M. (2014). Diet as a Therapy for Irritable Bowel Syndrome: Progress at Last. *Gastroenterology* *146*, 10–12.
- Singh, M., Suresh, K., Ho, L.C., Ng, G.C., and Yap, E.H. (1995). Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* *81*, 446–450.
- Sinn, D.H., Song, J.H., Kim, H.J., Lee, J.H., Son, H.J., Chang, D.K., Kim, Y.-H., Kim, J.J., Rhee, J.C., and Rhee, P.-L. (2008). Therapeutic effect of *Lactobacillus acidophilus*-SDC 2012, 2013 in patients with irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* *53*, 2714–2718.
- Smith, H.S. (2009). Hydrogen sulfide's involvement in modulating nociception. *Pain Physician* *12*, 901–910.
- Soares, R.L.S. (2014). Irritable bowel syndrome: a clinical review. *World J. Gastroenterol.* *20*, 12144–12160.
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., et al. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* *66*, 1039–1048.
- Song, S.-W., Park, S.-J., Kim, S.-H., and Kang, S.-G. (2012). Relationship between Irritable Bowel Syndrome, Worry and Stress in Adolescent Girls. *J. Korean Med. Sci.* *27*, 1398.
- Souppart, L., Sanciu, G., Cian, A., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Capron, M., Dei-Cas, E., Boorom, K., Delhaes, L., and Viscogliosi, E. (2009). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol. Res.* *105*, 413–421.
- Spencer, M., Chey, W.D., and Eswaran, S. (2014). Dietary Renaissance in IBS: Has Food Replaced Medications as a Primary Treatment Strategy? *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* *12*, 424–440.
- Spiegel, B.M.R., Bolus, R., Agarwal, N., Sayuk, G., Harris, L.A., Lucak, S., Esrailian, E., Chey, W.D., Lembo, A., Karsan, H., et al. (2010). Measuring symptoms in the irritable bowel syndrome: development of a framework for clinical trials. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *32*, 1275–1291.
- Spiegel, B., Bolus, R., Harris, L.A., Lucak, S., Naliboff, B., Esrailian, E., Chey, W.D., Lembo, A., Karsan, H., Tillisch, K., et al. (2009). Measuring irritable bowel syndrome patient-reported outcomes with an abdominal pain numeric rating scale. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *30*, 1159–1170.
- Spiller, R. (2008). Serotonin and GI clinical disorders. *Neuropharmacology* *55*, 1072–1080.
- Spiller, R.C. (2011). Targeting the 5-HT $_3$  receptor in the treatment of irritable bowel syndrome. *Curr. Opin. Pharmacol.* *11*, 68–74.
- Spiller, R., and Garsed, K. (2009). Postinfectious Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *136*, 1979–1988.
- Spiller, R., and Lam, C. (2012). An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *18*, 258–268.
- Stark, D., van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J., and 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*, 11–20.
- Staudacher, H.M., Irving, P.M., Lomer, M.C.E., and Whelan, K. (2014). Mechanisms and efficacy of dietary FODMAP restriction in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *11*, 256–266.
- Staudacher, H.M., Lomer, M.C.E., Farquharson, F.M., Louis, P., Fava, F., Franciosi, E., Scholz, M., Tuohy, K.M., Lindsay, J.O., Irving, P.M., et al. (2017). A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome and A Probiotic Restores Bifidobacterium Species: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* *153*, 936–947.
- Steck, N., Mueller, K., Schemann, M., and Haller, D. (2012). Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* *61*, 1610–1618.
- Stensvold, C.R., and Clark, C.G. (2016). Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol. Int.* *65*, 763–771.
- Stensvold, C.R., Arendrup, M.C., Jespersgaard, C., Mølbak, K., and Nielsen, H. V. (2007). Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *59*, 303–307.
- Stensvold, C.R., Alfellani, M.A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E.L., Maddox, C., Nielsen, H. V., and Clark, C.G. (2009a). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol.* *39*, 473–479.
- Stensvold, C.R., Nielsen, H. V., Mølbak, K., and Smith, H. V. (2009b). Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol.* *25*, 23–29.
- Stensvold, C.R., Smith, H. V., Nagel, R., Olsen, K.E.P., and Traub, R.J. (2010). Eradication of *Blastocystis* Carriage With Antimicrobials: Reality or Delusion? *J. Clin. Gastroenterol.* *44*, 85–90.
- Stensvold, C.R., Ahmed, U.N., Andersen, L.O., and Nielsen, H.V. (2012). 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.* *50*, 1847–1851.
- Stensvold, C.R., Lewis, H.C., Hammerum, A.M., Porsbo, L.J., Nielsen, S.S., Olsen, K.E.P., Arendrup, M.C., Nielsen, H. V., And Mølbak, K. (2009). *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol. Infect.* *137*, 1655.
- Stenzel, D.J., and Boreham, P.F. (1996). *Blastocystis* hominis revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* *9*, 563–584.
- Stenzel, D.J., Lee, M.G., and Boreham, P.F. (1997). Morphological differences in *Blastocystis* cysts—an indication of different species? *Parasitol. Res.* *83*, 452–457.
- Stevenson, C., Blaauw, R., Fredericks, E., Visser, J., and Roux, S. (2014). Randomized clinical trial: effect of *Lactobacillus plantarum* 299 v on symptoms of irritable bowel syndrome. *Nutrition* *30*, 1151–1157.
- Su, T., Liu, R., Lee, A., Long, Y., Du, L., Lai, S., Chen, X., Wang, L., Si, J., Owyang, C., et al. (2018). Altered Intestinal Microbiota with Increased Abundance of *Prevotella* Is Associated with High Risk of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol. Res. Pract.* *2018*, 6961783.
- Suresh, K., and Smith, H. (2004). Comparison of methods for detecting *Blastocystis* hominis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *23*, 509–511.
- Suresh, K., Ng, G.C., Ramachandran, N.P., Ho, L.C., Yap, E.H., and Singh, M. (1993). *In vitro* encystment and experimental infections of *Blastocystis* hominis. *Parasitol. Res.* *79*, 456–460.

- Swan, C., Duroudier, N.P., Campbell, E., Zaitoun, A., Hastings, M., Dukes, G.E., Cox, J., Kelly, F.M., Wilde, J., Lennon, M.G., et al. (2013). Identifying and testing candidate genetic polymorphisms in the irritable bowel syndrome (IBS): association with TNFSF15 and TNF $\alpha$ . *Gut* 62, 985–994.
- Tack, J., and Corsetti, M. (2012). Prucalopride: evaluation of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy and safety in the treatment of chronic constipation. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8, 1327–1335.
- Tack, J., Camilleri, M., Chang, L., Chey, W.D., Galligan, J.J., Lacy, B.E., Müller-Lissner, S., Quigley, E.M.M., Schuurkes, J., De Maeyer, J.H., et al. (2012). Systematic review: cardiovascular safety profile of 5-HT(4) agonists developed for gastrointestinal disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35, 745–767.
- Tan, K.S.W. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Vet. Parasitol.* 126, 121–144.
- Tan, K.S.W. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 639–665.
- Tan, H.K., and Zierdt, C.H. (1973). Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Z. Parasitenkd.* 42, 315–324.
- Tan, T.C., and Suresh, K.G. (2006a). Amoeboid form of *Blastocystis hominis* - a detailed ultrastructural insight. *Parasitol. Res.* 99, 737–742.
- Tan, T.C., and Suresh, K.G. (2006b). Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol. Res.* 98, 189–193.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., and Macia, L. (2014). The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In *Advances in Immunology*, pp. 91–119.
- Tan, K.S.W., Mirza, H., Teo, J.D.W., Wu, B., and MacAry, P.A. (2010). Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12, 28–35.
- Tan, S.W., Singh, M., Yap, E.H., Ho, L.C., Moe, K.T., Howe, J., and Ng, G.C. (1996). Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. *Parasitol. Res.* 82, 375–377.
- Tan, T.C., Ong, S.C., and Suresh, K.G. (2009). Genetic variability of *Blastocystis* sp. isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol. Res.* 105, 1283–1286.
- Tana, C., Umesaki, Y., Imaoka, A., Handa, T., Kanazawa, M., and Fukudo, S. (2010). Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 512–519, e114-5.
- Tap, J., Derrien, M., Törnblom, H., Brazeilles, R., Cools-Portier, S., Doré, J., Störsrud, S., Le Nevé, B., Öhman, L., and Simrén, M. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 152, 111–123.e8.
- Taşova, Y., Sahin, B., Koltaş, S., and Paydaş, S. (2000). Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy. *Acta Med. Okayama* 54, 133–136.
- Taverniti, V., and Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 6, 261–274.
- Teo, J.D.W., MacAry, P.A., and Tan, K.S.W. (2014). Pleiotropic Effects of *Blastocystis* spp. Subtypes 4 and 7 on Ligand-Specific Toll-Like Receptor Signaling and NF- $\kappa$ B Activation in a Human Monocyte Cell Line. *PLoS One* 9, e89036.

- Termmathurapoj, S., Leelayoova, S., Aimpun, P., Thathaisong, U., Nimmanon, T., Taamasri, P., and Mungthin, M. (2004). The usefulness of short-term *in vitro* cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol. Res.* *93*, 445–447.
- Thiennimitr, P., Winter, S.E., Winter, M.G., Xavier, M.N., Tolstikov, V., Huseby, D.L., Sterzenbach, T., Tsois, R.M., Roth, J.R., and Bäumlér, A.J. (2011). Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17480–17485.
- Toro Monjaraz, E.M., Vichido Luna, M.A., Montijo Barrios, E., Cervantes Bustamante, R., Zárate Mondragón, F., Huante Anaya, A., Cadena León, J., Mendez, M.C., López Ugalde, M., and Ramirez Mayans, J.A. (2018). *Blastocystis Hominis* and Chronic Abdominal Pain in Children: Is there an Association between Them? *J. Trop. Pediatr.* *64*, 279–283.
- Treem, W.R., Ahsan, N., Kastoff, G., and Hyams, J.S. (1996). Fecal short-chain fatty acids in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: *in vitro* studies of carbohydrate fermentation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *23*, 280–286.
- Trimble, K.C., Farouk, R., Pryde, A., Douglas, S., and Heading, R.C. (1995). Heightened visceral sensation in functional gastrointestinal disease is not site-specific. Evidence for a generalized disorder of gut sensitivity. *Dig. Dis. Sci.* *40*, 1607–1613.
- Tsuchiya, J., Barreto, R., Okura, R., Kawakita, S., Fesce, E., and Marotta, F. (2004). Single-blind follow-up study on the effectiveness of a symbiotic preparation in irritable bowel syndrome. *Chin. J. Dig. Dis.* *5*, 169–174.
- Uhde, M., Ajamian, M., Caio, G., De Giorgio, R., Indart, A., Green, P.H., Verna, E.C., Volta, U., and Alaedini, A. (2016). Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut* *65*, 1930–1937.
- Underhill, D.M., and Iliev, I.D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 405–416.
- De Vadder, F., Grasset, E., Mannerås Holm, L., Karsenty, G., Macpherson, A.J., Olofsson, L.E., and Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 6458–6463.
- Valeur, J., Undseth, R., Jakobsdottir, G., Nyman, M., and Berstad, A. (2015). Low serum levels of short-chain fatty acids after lactulose ingestion may indicate impaired colonic fermentation in patients with irritable bowel syndrome. *Clin. Exp. Gastroenterol.* *8*, 303.
- Del Valle-Pinero, A.Y., Van Deventer, H.E., Fourie, N.H., Martino, A.C., Patel, N.S., Remaley, A.T., and Henderson, W.A. (2013). Gastrointestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome assessed using a four probe permeability solution. *Clin. Chim. Acta.* *418*, 97–101.
- Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Tito, R.Y., Joossens, M., and Raes, J. (2016). Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* *65*, 57–62.
- Vanner, S.J., Greenwood-Van Meerveld, B., Mawe, G.M., Shea-Donohue, T., Verdu, E.F., Wood, J., and Grundy, D. (2016). Fundamentals of Neurogastroenterology: Basic Science. *Gastroenterology* *150*, 1280–1291.
- Van der Veek, P.P.J., van Rood, Y.R., and Masclee, A.A.M. (2008). Symptom Severity but Not Psychopathology Predicts Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *6*, 321–328.
- Vidlock, E.J., Adeyemo, M., Licudine, A., Hirano, M., Ohning, G., Mayer, M., Mayer, E.A., and Chang, L. (2009).

- Childhood trauma is associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 137, 1954–1962.
- Vidlock, E.J., Shih, W., Adeyemo, M., Mahurkar-Joshi, S., Presson, A.P., Polytarchou, C., Alberto, M., Iliopoulos, D., Mayer, E.A., and Chang, L. (2016). The effect of sex and irritable bowel syndrome on HPA axis response and peripheral glucocorticoid receptor expression. *Psychoneuroendocrinology* 69, 67–76.
- Viney, M.E., and Graham, A.L. (2013). Patterns and Processes in Parasite Co-Infection. In *Advances in Parasitology*, pp. 321–369.
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., Ramasamy, U., Schols, H.A., and De Vos, P. (2015). Immunological properties of inulin-type fructans. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 414–436.
- Vork, L., Weerts, Z.Z.R.M., Mujagic, Z., Kruijmel, J.W., Hesselink, M.A.M., Muris, J.W.M., Keszthelyi, D., Jonkers, D.M.A.E., and Masclee, A.A.M. (2018). Rome III vs Rome IV criteria for irritable bowel syndrome: A comparison of clinical characteristics in a large cohort study. *Neurogastroenterol. Motil.* 30, e13189.
- Vulevic, J., Juric, A., Walton, G.E., Claus, S.P., Tzortzis, G., Toward, R.E., and Gibson, G.R. (2015). Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabolomics in elderly persons. *Br. J. Nutr.* 114, 586–595.
- Waehrens, R., Ohlsson, H., Sundquist, J., Sundquist, K., and Zöller, B. (2015). Risk of irritable bowel syndrome in first-degree, second-degree and third-degree relatives of affected individuals: a nationwide family study in Sweden. *Gut* 64, 215–221.
- Wang, W., Bielefeldt-Ohmann, H., Traub, R.J., Cuttell, L., and Owen, H. (2014a). Location and Pathogenic Potential of *Blastocystis* in the Porcine Intestine. *PLoS One* 9, e103962.
- Wang, W., Cuttell, L., Traub, R.J., Owen, H., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2014b). Characterization of the *Blastocystis*-specific faecal IgA immune response in pigs. *Parasite Immunol.* 36, 503–508.
- Watkins, R.R., and Eckmann, L. (2014). Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 16, 396.
- Wawrzyniak, I., Roussel, M., Diogon, M., Couloux, A., Texier, C., Tan, K.S.W., Vivarès, C.P., Delbac, F., Wincker, P., and El Alaoui, H. (2008). Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *Int. J. Parasitol.* 38, 1377–1382.
- Wawrzyniak, I., Texier, C., Poirier, P., Viscogliosi, E., Tan, K.S.W., Delbac, F., and El Alaoui, H. (2012). Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitol. Int.* 61, 437–442.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., and Alaoui, H.E. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 1, 167–178.
- Wawrzyniak, I., Courtine, D., Osman, M., Hubans-Pierlot, C., Cian, A., Nourrisson, C., Chabe, M., Poirier, P., Bart, A., Polonais, V., et al. (2015). Draft genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. *Genomics Data* 4, 22–23.
- Weber, C., Koutero, M., Dillies, M.-A., Varet, H., Lopez-Camarillo, C., Coppée, J.Y., Hon, C.-C., and Guillén, N. (2016). Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. *Sci. Rep.* 6, 35852.
- Weissfeld, A.S., and Sonnenwirth, A.C. (1982). Rapid isolation of *Yersinia* spp. from feces. *J. Clin. Microbiol.* 15,

508–510.

Wensaas, K.-A., Langeland, N., Hanevik, K., Mørch, K., Eide, G.E., and Rortveit, G. (2012). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: historic cohort study. *Gut* 61, 214–219.

Whelan, K., Martin, L.D., Staudacher, H.M., and Lomer, M.C.E. (2018). The low FODMAP diet in the management of irritable bowel syndrome: an evidence-based review of FODMAP restriction, reintroduction and personalisation in clinical practice. *J. Hum. Nutr. Diet.* 31, 239–255.

Whitehead, W.E., Holtkotter, B., Enck, P., Hoelzl, R., Holmes, K.D., Anthony, J., Shabsin, H.S., and Schuster, M.M. (1990). Tolerance for rectosigmoid distention in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 98, 1187–1192.

Whitehead, W.E., Palsson, O., and Jones, K.R. (2002). Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: what are the causes and implications? *Gastroenterology* 122, 1140–1156.

Whorwell, P.J., Lupton, E.W., Erduran, D., and Wilson, K. (1986). Bladder smooth muscle dysfunction in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 27, 1014–1017.

Whorwell, P.J., Altringer, L., Morel, J., Bond, Y., Charbonneau, D., O'Mahony, L., Kiely, B., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2006). Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1581–1590.

Wilcz-Villega, E., McClean, S., and O'Sullivan, M. (2014). Reduced E-cadherin expression is associated with abdominal pain and symptom duration in a study of alternating and diarrhea predominant IBS. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 316–325.

Wilson, B., and Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 32 Suppl 1, 64–68.

Wohlfarth, C., Schmitteckert, S., Härtle, J.D., Houghton, L.A., Dweep, H., Fortea, M., Assadi, G., Braun, A., Mederer, T., Pöhner, S., et al. (2017). miR-16 and miR-103 impact 5-HT<sub>4</sub> receptor signalling and correlate with symptom profile in irritable bowel syndrome. *Sci. Rep.* 7, 14680.

Wouters, M.M., Lambrechts, D., Knapp, M., Cleynen, I., Whorwell, P., Agréus, L., Dlugosz, A., Schmidt, P.T., Halfvarson, J., Simrén, M., et al. (2014). Genetic variants in CDC42 and NXPH1 as susceptibility factors for constipation and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. *Gut* 63, 1103–1111.

Wu, Z., Mirza, H., Teo, J.D.W., and Tan, K.S.W. (2014a). 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, 1–11.

Wu, Z., Mirza, H., and Tan, K.S.W. (2014b). 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, e2885.

Wunder, C., Churin, Y., Winau, F., Warnecke, D., Vieth, M., Lindner, B., Zähringer, U., Mollenkopf, H.-J., Heinz, E., and Meyer, T.F. (2006). Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat. Med.* 12, 1030–1038.

Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam, M., Beg, M.A., and Zaman, V. (2004). Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 383–385.

Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., and Khan, R. (2010). *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol. Res.* 107, 679–684.

- Yakoob, J., Abbas, Z., Usman, M.W., Sultana, A., Islam, M., Awan, S., Ahmad, Z., Hamid, S., And Jafri, W. (2014). Cytokine changes in colonic mucosa associated with *Blastocystis* spp. subtypes 1 and 3 in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Parasitology* 141, 957–969.
- Yan, Y., Su, S., Lai, R., Liao, H., Ye, J., Li, X., Luo, X., and Chen, G. (2006). Genetic variability of *Blastocystis* hominis isolates in China. *Parasitol. Res.* 99, 597–601.
- Yao, F., Qiao, J., Zhao, Y., Zhang, X., Yang, J., and Li, X. (2005). [Experimental infection of mice with *Blastocystis* hominis]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 23, 444–448.
- Yersal, O., Malatyali, E., Ertabaklar, H., Oktay, E., Barutca, S., and Ertug, S. (2016). *Blastocystis* subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics. *Parasitol. Int.* 65, 792–796.
- Yoshikawa, H., Kuwayama, N., and Enose, Y. Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis* hominis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 70–74.
- Yoshikawa, H., Zhiliang, A., Ae, W., Kimata, I., Iseki, M., Ibne, A., Ali, K.M.D., Hossain, M.B., Viqar, A., Rashidul, Z., et al. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis* hominis populations isolated from different countries.
- Yoshikawa, H., Satoh, J., and Enose, Y. (1995). Light and electron microscopic localization of lipids in *Blastocystis* hominis. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 44, 100–103.
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., and Kimata, I. (2004). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis* hominis in rats. *Parasitol. Res.* 94, 391–396.
- Yoshikawa, H., Tokoro, M., Nagamoto, T., Arayama, S., Asih, P.B.S., Rozi, I.E., and Syafruddin, D. (2016). Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol. Int.* 65, 780–784.
- Youn, Y.H., Kim, H.C., Lim, H.C., Park, J.J., Kim, J.-H., and Park, H. (2016). Long-term Clinical Course of Post-infectious Irritable Bowel Syndrome After Shigellosis: A 10-year Follow-up Study. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 22, 490–496.
- Young, C.R., and Yeo, F.E. (2014). *Blastocystis* and Schistosomiasis Coinfection in a Patient with Chronic Kidney Disease. *Case Rep. Med.* 2014, 1–3.
- Zahedi, M.J., Behrouz, V., and Azimi, M. (2018). Low fermentable oligo-di-mono-saccharides and polyols diet versus general dietary advice in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: A randomized controlled trial. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 33, 1192–1199.
- Zaman, V., Howe, J., and Ng, M. (1995). Ultrastructure of *Blastocystis* hominis cysts. *Parasitol. Res.* 81, 465–469.
- Zaman, V., Howe, J., and Ng, M. (1997). Observations on the surface coat of *Blastocystis* hominis. *Parasitol. Res.* 83, 731–733.
- Zaman, V., Zaki, M., Manzoor, M., Howe, J., and Ng, M. (1999). Postcystic development of *Blastocystis* hominis. *Parasitol. Res.* 85, 437–440.
- Zanini, B., Ricci, C., Bandera, F., Caselani, F., Magni, A., Laronga, A.M., Lanzini, A., and San Felice del Benaco Study Investigators (2012). Incidence of post-infectious irritable bowel syndrome and functional intestinal disorders following a water-borne viral gastroenteritis outbreak. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 891–899.
- Zhang, X., Zhang, S., Qiao, J., Wu, X., Zhao, L., Liu, Y., and Fan, X. (2012). Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis* hominis. *Parasitol. Res.* 110, 1165–1172.

- Zhang, Y., Li, Z., and Han, F. (2018). Electroacupuncture for patients with irritable bowel syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 97, e11627.
- Zhou, Q., Zhang, B., and Verne, N.G. (2009). Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 146, 41–46.
- Zhou, Q., Souba, W.W., Croce, C.M., and Verne, G.N. (2010). MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 59, 775–784.
- Zhou, Q., Costinean, S., Croce, C.M., Brasier, A.R., Merwat, S., Larson, S.A., Basra, S., and Verne, G.N. (2015). MicroRNA 29 targets nuclear factor- $\kappa$ B-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability. *Gastroenterology* 148, 158–169.e8.
- Zhou, Q., Yang, L., Larson, S., Basra, S., Merwat, S., Tan, A., Croce, C., and Verne, G.N. (2016). Decreased miR-199 augments visceral pain in patients with IBS through translational upregulation of TRPV1. *Gut* 65, 797–805.
- Zhou, S.-Y., Gilliland, M., Wu, X., Leelasinjaroen, P., Zhang, G., Zhou, H., Ye, B., Lu, Y., and Owyang, C. (2018). FODMAP diet modulates visceral nociception by lipopolysaccharide-mediated intestinal inflammation and barrier dysfunction. *J. Clin. Invest.* 128, 267–280.
- Zhu, X., Chen, W., Zhu, X., and Shen, Y. (2014). A cross-sectional study of risk factors for irritable bowel syndrome in children 8-13 years of age in suzhou, china. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2014, 198461.
- Zhuang, X., Xiong, L., Li, L., Li, M., and Chen, M. (2017). Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 32, 28–38.
- Zierdt, C.H. (1973). Studies of *Blastocystis hominis*. *J. Protozool.* 20, 114–121.
- Zierdt, C.H. (1988). *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. *Parasitol. Today* 4, 15–17.
- Zierdt, C.H. (1991). *Blastocystis hominis*--past and future. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 61–79.
- Zierdt, C.H., and Nagy, B. (1993). Antibody response to *Blastocystis hominis* infections. *Ann. Intern. Med.* 118, 985–986.
- Zierdt, C.H., and Williams, R.L. (1974). *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* 36, 233–243.
- Zierdt, C.H., Zierdt, W.S., and Nagy, B. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *J. Parasitol.* 81, 127–129.
- Zigheboim, J., Talley, N.J., Phillips, S.F., Harsen, W.S., and Zinsmeister, A.R. (1995). Visceral perception in irritable bowel syndrome. Rectal and gastric responses to distension and serotonin type 3 antagonism. *Dig. Dis. Sci.* 40, 819–827.
- Zucchelli, M., Camilleri, M., Nixon Andreasson, A., Bresso, F., Dlugosz, A., Halfvarson, J., Torkvist, L., Schmidt, P.T., Karling, P., Ohlsson, B., et al. (2011). Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome. *Gut* 60, 1671–1677.
- Zuel-Fakkar, N.M., Abdel Hameed, D.M., and Hassanin, O.M. (2011). Study of *Blastocystis hominis* isolates in urticaria: a case-control study. *Clin. Exp. Dermatol.* 36, 908–910.

## Mise en place d'un modèle animal d'infection par *Blastocystis*: Répercussions sur la sensibilité colique, le comportement et le microbiote intestinal

Les douleurs abdominales chroniques, souvent associées à une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), sont l'un des symptômes majeurs constatés lors du syndrome de l'intestin irritable (SII). Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle touchant environ 11% de la population mondiale et altérant significativement la qualité de vie des patients. L'étiologie multifactorielle de cette pathologie rend la physiopathologie complexe. Les gastroentérites infectieuses ont été décrites comme l'un des facteurs de risque dans le développement du SII-post-infectieux (SII-PI). Le SII-PI survient en effet dans 4 à 31% des cas suite à une gastroentérite aiguë d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. Ces infections peuvent avoir de nombreuses répercussions et en particulier sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, le système immunitaire ou encore sur le microbiote intestinal. Par ailleurs, suite à une infection parasitaire, le risque de développer un SII est de 40% contre seulement 14% suite à une infection bactérienne.

*Blastocystis* est le parasite intestinal le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme. Néanmoins, malgré de récentes études épidémiologiques rapportant une plus forte prévalence de ce parasite chez les patients atteints de SII, son rôle en santé humaine reste débattu. De plus, d'autres études rapportent que les individus porteurs de ce parasite présentent des douleurs abdominales et sont atteints d'une dysbiose intestinale. Actuellement, l'absence d'un modèle animal d'infection par *Blastocystis* reproductible ne permet pas d'étudier les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection et donc d'explorer la contribution éventuelle de ce parasite dans le SII.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient tout d'abord de mettre en place un modèle murin d'infection expérimentale par *Blastocystis* pour dans un deuxième temps évaluer si ce parasite est capable d'induire une HSVC et une dysbiose intestinale avec l'objectif d'établir un nouveau modèle de SII d'origine infectieuse chez le rat. Pour répondre au premier objectif, le pouvoir infectieux de différents sous-types et différentes formes du parasite (formes vacuolaires ou kystes), isolés de cultures axéniques ou purifiés à partir de selles de patients et d'animaux a été évalué chez des animaux de laboratoire (rats et souris). Nous avons ainsi réussi à établir un modèle reproductible d'infection chronique par *Blastocystis* chez le rat de laboratoire à l'aide de kystes purifiés à partir de selles humaines. L'utilisation de ce modèle *in vivo*, nous a permis de mettre en évidence que le sous-type 4 (ST4) de *Blastocystis* induit une HSVC sans origine inflammatoire chez les rats expérimentalement infectés. De plus, les animaux développent un comportement type anxio-dépressif corrélé à l'HSVC. La dysbiose intestinale associée à l'infection se caractérise par une augmentation de la richesse bactérienne et une diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Par ailleurs, nous avons corrélé l'HSVC à l'augmentation de l'abondance relative du genre *Bacteroides* et la diminution de l'abondance relative de la famille des *Clostridiaceae*, bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte (AGCC). Une diminution des taux d'AGCC fécaux a d'ailleurs été constatée chez les rats infectés. De plus, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité de protéases à sérine dans les fèces des animaux infectés pouvant expliquer l'HSVC.

Ces données suggèrent qu'une infection gastro-intestinale par *Blastocystis* serait associée à une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) et à un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose). Ainsi, ce nouveau modèle d'infection pourrait être un bon modèle de SII d'origine infectieuse et pourrait donc contribuer à un meilleur diagnostic et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies chroniques de l'intestin chez certains individus.